



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Paratuberculosis bovina: diagnóstico, prevención y
control en hatos lecheros**

TESINA

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Lilian Giovanna SÁNCHEZ ROSALES

ASESOR

Rocío Silvia SANDOVAL MONZÓN

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

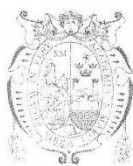
Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sánchez L. Paratuberculosis bovina: diagnóstico, prevención y control en hatos lecheros [Tesina]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

- CODIGO ORCID DEL AUTOR :0000- 0001-5871-5197
- CODIGO ORCID DEL ASESOR :0000-0002-6249-9076
- DNI AUTOR :43422282
- DNI DEL ASESOR : 40671202
- GRUPO DE INVESTIGACION: REPRODUCCION Y SANIDAD ANIMAL(GIRESA)
- INSTITUCION QUE FINANCIA PARCIAL O TALMENTE LA INVESTIGACIÓN: SIN FINANCIAMIENTO.
- UBICACIÓN GEOGRAFICA DONDE SE DESARROLLA LA INVESTIGACION: AVENIDA CIRCUNVALACION 2800, SAN BORJA 15021. LIMA-PEPU.
- AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACION ABARCO : 1AÑO




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

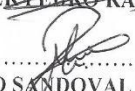
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 001-PROG-TUTORÍA/FMV-2018.

PRESIDENTE:


OLGER PEDRO RAMOS COAGUILA

MIEMBROS :


ROCÍO SANDOVAL MONZÓN
ASESORA DE LA TESINA



CEESAR ALTHION AGUILAR GUEVARA


JUAN JOSÉ SIUCE MORENO

San Borja, 11 de noviembre de 2019

V° B°




Dra. Daphne Ramos Delgado
Directora

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**PROGRAMA DE TUTORÍA EN INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO POR LA
MODALIDAD DE EXAMEN DE APTITUD PROFESIONAL**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **viernes 09 de octubre de 2019**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 001-PROG-TUTORÍA/FMV-2019, integrado por los siguientes profesores:

MVZ.	Olger Pedro Ramos Coaguila	Presidente del Jurado
MV. Mg.	Rocío Silvia Sandoval Monzón	Tutor
MV. Mg.	Cesar Nithon Aguilar Guevara	Miembro del Jurado
MV. Mg.	Juan José Siuce Moreno	Miembro del Jurado


Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **SÁNCHEZ ROSALES, LILIAN GIOVANNA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesina:

**“PARATUBERCULOSIS BOVINA: DIAGNÓSTICO, PREVENCIÓN Y
CONTROL EN HATOS LECHEROS”**

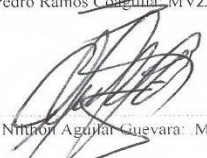
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesina y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISÉIS (16)**.


Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesina, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:55 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesina en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Olger Pedro Ramos Coaguila, MVZ. Prof. Asociado, D.E.


Rocío Sandoval Monzón, MV Mg. Prof. Asociado, D.E.


Cesar Nithon Aguilar Guevara, MV. Mg. Prof. Auxiliar, T.C.


Juan José Siuce Moreno, MV. Mg. Prof. Auxiliar, D.E.



ÍNDICE

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Generalidades de la paratuberculosis bovina	3
2.1.1. Epidemiología	4
2.1.2. Impacto económico de la enfermedad	12
2.1.3. Potencial zoonótico de la enfermedad	14
2.1.4. Fisiopatología de la enfermedad	16
2.1.5. Fases de la enfermedad	17
2.1.5.1. Infección silente	17
2.1.5.2. Enfermedad subclínica	18
2.1.5.3. Enfermedad clínica	19
2.1.5.4. Enfermedad clínica avanzada	21
2.2. <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	22
2.2.1. Transmisión y fuentes de infección del agente	26
2.2.2. Respuesta inmunológica frente al agente	27
2.2.2.1. Inmunidad celular	28
2.2.2.2. Inmunidad humoral	28
2.3. Diagnóstico de la paratuberculosis bovina	30
2.3.1. Diagnóstico clínico	30
2.3.2. Diagnóstico anatomo-patológico	32
2.3.2.1. Lesiones macroscópicas	32
2.3.2.2. Lesiones microscópicas	33
2.3.3. Técnicas para detectar el agente patógeno	35

2.3.3.1. Análisis microscópico	36
2.3.3.2. Cultivo	37
2.3.3.3. Identificación genética con la reacción en cadena de la polimerasa	39
2.3.4. Técnicas de detección de la inmunidad celular	41
2.3.4.1. Reacción intradérmica	41
2.3.4.2. Prueba de interferón gamma	43
2.3.5. Técnicas de detección de la inmunidad humoral	44
2.3.5.1. Fijación de complemento	44
2.3.5.2. Inmunodifusión de agar gel	44
2.3.5.3. Prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas	45
2.3.6. Aplicabilidad de las pruebas diagnósticas	46
2.4. Eliminación y control de la enfermedad	48
2.5. Experiencia de los programas de control y prevención en el mundo	51
2.6. Determinación de la prevalencia	55
2.7. Medidas de bioseguridad	57
2.8. Medidas de manejo	58
2.8.1. Medidas de manejo orientadas a las crías	58
2.8.2. Medidas de manejo orientadas a los adultos	59
2.9. Eliminación de animales infectados	60
2.9.1. En la fase clínica	61
2.9.2. En la fase subclínica	61
2.10. Vacunación	61
III. CONCLUSIONES	63
IV. RECOMENDACIONES	64

LISTA DE CUADROS

N°	Título	Pág.
Cuadro 1.	Prevalencias de la paratuberculosis bovina reportadas a nivel mundial	7
Cuadro 2.	Distribución de los resultados del análisis diagnóstico de paratuberculosis utilizando una prueba de ELISA indirecta en muestras de bovinos en Perú	10
Cuadro 3.	Prevalencia de paratuberculosis en rumiantes silvestres (España)	11
Cuadro 4.	Micobacterias presentes en animales y el hombre	22
Cuadro 5.	Aplicabilidad de las pruebas diagnósticas para detectar paratuberculosis en bovinos	46
Cuadro 6.	Tipos de pruebas diagnósticas utilizadas en los programas de control de paratuberculosis	47
Cuadro 7.	Principales objetivos de los programas de control de paratuberculosis	49
Cuadro 8.	Prácticas de control de paratuberculosis en países con un programa oficial de control	52
Cuadro 9.	Pruebas recomendadas por la OIE para diagnosticar paratuberculosis en bovinos	56

LISTA DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
Figura 1.	El “fenómeno iceberg” en el desarrollo de la paratuberculosis bovina	6
Figura 2.	Pérdida de la condición corporal en un bovino con paratuberculosis	20
Figura 3.	Edema mandibular en un bovino con paratuberculosis avanzada	21
Figura 4.	Genoma de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	26
Figura 5.	Representación esquemática del desarrollo de inmunidad en la paratuberculosis bovina	29
Figura 6.	Enteritis granulomatosa crónica en el intestino de un bovino	33
Figura 7.	Lesiones microscópicas intestinales de paratuberculosis bovina (A, B)	34
Figura 8.	Lesiones microscópicas intestinales de paratuberculosis bovina (C, D)	34
Figura 9.	Lesiones microscópicas intestinales de paratuberculosis bovina (E, F)	35
Figura 10.	Organismos ácido-resistentes compatibles con <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	36
Figura 11.	Colonias de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	38
Figura 12.	Fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa y visualizados en gel agarosa al 1%	40
Figura 13.	Reacción intradérmica utilizando derivado PPD Johnin	42
Figura 14.	Inmunodifusión en agar gel	45

RESUMEN

La paratuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa presente en nuestro país, que se caracteriza por una enteritis crónica debilitante en bovinos adultos. Causa grandes pérdidas económicas para los ganaderos debido al descarte prematuro de los animales afectados y la disminución en la producción de carne y leche. Actualmente, sólo 22 países cuentan con un programa formal de control y eliminación de la enfermedad, la mayoría de Europa. En sur y Centroamérica, el 76% de los países no cuentan con programas oficiales de control de esta enfermedad. El diagnóstico de paratuberculosis es complicado debido a las características del agente patógeno, el largo período de incubación y el cambio en la respuesta inmune. La ausencia de una técnica de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad en las diferentes fases de la enfermedad es uno de los principales problemas para la determinación de la prevalencia, para el control y eliminación de la paratuberculosis bovina en los establos lecheros. Por ahora, la prueba de ELISA es el método de diagnóstico más económico y práctico de realizar en campo, pero debe complementarse con otra prueba adicional tal como PCR, y se debe establecer un protocolo que aplique ambas técnicas de forma rutinaria, recomendablemente cada seis meses, para detectar los animales positivos a la enfermedad. Los bovinos con enfermedad clínica y los que salgan positivos a ELISA en tres veces consecutivas o a PCR en cualquier momento deben ser eliminados del hato. Como medida de control, la formación de un hato paralelo puede ser una buena alternativa para originar un hato libre de la enfermedad a partir de un hato infectado. El ternero recién nacido debe ser separado inmediatamente después de nacer y alimentado con calostro y leche de vacas negativas a paratuberculosis. Estos animales del nuevo hato, negativos a la enfermedad, deben ser sometidos a estrictas medidas de manejo y bioseguridad.

Palabras clave: paratuberculosis, bovinos, diagnóstico, control, eliminación.

ABSTRACT

Bovine paratuberculosis is an infectious disease present in our country, which is characterized by a debilitating chronic enteritis in adult cattle. It causes significant economic losses for farmers due to premature disposal of affected animals and the decrease in meat and milk production. Currently, only 22 countries have an official program for control and elimination, most states in Europe. In South and Central America, 76% of countries do not have official programs to control this disease. The diagnosis of paratuberculosis is complicated due to the characteristics of the pathogen, the long incubation period and the change in the immune response. The absence of a diagnostic technique with high sensitivity and specificity in the different phases of the disease is one of the main problems for determining prevalence, for the control and elimination of bovine paratuberculosis in dairy herds. For now, the ELISA test is the most economical and practical diagnostic method to perform in field, but it must be complemented with another additional test such as PCR, and a protocol must be established that applies both techniques routinely, recommended every six months, to detect animals positive for the disease. Cattle with clinical disease and those that are positive for ELISA three consecutive times or PCR at any time should be removed from the herd. As a control measure, the formation of a parallel herd may be a good alternative to originate a disease-free herd from an infected herd. The newborn calf should be separated immediately after birth and fed with colostrum and milk from cows negative for paratuberculosis. These animals of the new herd, negatives to the disease, must undergo strict management and biosecurity measures.

Keywords: paratuberculosis, bovines, diagnosis, control, elimination.

I. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis bovina se caracteriza por una enteritis crónica debilitante en animales adultos, que conduce a una progresiva emaciación y posterior muerte de los animales afectados, es causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*M. avium paratuberculosis*) (Pavlik *et al.*, 2009). Esta enfermedad tiene un gran impacto económico en los países ganaderos ya que causa pérdidas económicas directas e indirectas por el descarte prematuro de los animales afectados y la disminución en la producción de carne y leche, respectivamente (Constable *et al.*, 2017).

La micobacteria es diseminada principalmente a través de las heces de los animales afectados, pero también se ha detectado en calostro, leche y semen (Fecteau, 2017). Además, se ha aislado de órganos reproductivos de animales infectados y de fetos provenientes de vacas infectadas, suponiendo una transmisión intrauterina (Gwozdz, 2010; Stabel *et al.*, 2015). Esta enfermedad persiste en forma subclínica por varios años (Yoo y Shin, 2012), con una lenta diseminación y un período de incubación que varía de 1 a 5 años (Yamasaki *et al.*, 2013).

Un signo clínico común es la pérdida progresiva de peso, aunque el animal afectado tiene un apetito normal, además se observa una diarrea intermitente (Sweeney, 2015). Algunas veces se observa fiebre leve y edema en la región submandibular (Constable *et al.*, 2017). Otros signos clínicos son debilidad general (Yoo y Shin, 2012), disminución de la producción láctea (García y Shalloo, 2015), menor eficiencia reproductiva (Fecteau, 2017) e incremento de la susceptibilidad a otras enfermedades (Lombard, 2011), lo que conlleva a considerables pérdidas económicas de los productores, en especial de la industria lechera, que además de la producción láctea pierden vientres y material genético valioso, disminuyendo la rentabilidad de la industria local y el comercio internacional (Hasonova y Pavlik, 2006).

El diagnóstico de paratuberculosis es difícil de realizar por las características de crecimiento de la micobacteria y el cambio en la respuesta inmune del animal afectado (Gilardoni *et al.*, 2012). Asimismo, el largo período de incubación de la

enfermedad y la tardía aparición de los signos clínicos impide que la infección sea identificada tempranamente por los productores, conduciendo a una extensa diseminación del agente dentro del hato, antes de poder tomar medidas de control (Fecteau, 2017).

Debido a su distribución mundial, la reciente confirmación de la detección de *M. avium paratuberculosis* en la leche y subproductos lácteos (Gerrard *et al.*, 2018), y su posible relación con la enfermedad de Crohn, se ha intensificado el interés con relación a la salud animal y humana (Yoo y Shin, 2012; Barratt *et al.*, 2018), realizando estudios sobre el control y prevención de la enfermedad, aplicando estrategias tales como la bioseguridad, detección de animales positivos y eliminación inmediata, hasta la vacunación (Munir *et al.*, 2014; Nielsen, 2014; Donat *et al.*, 2016).

Por lo tanto, la presente revisión brinda información sobre las actuales técnicas de diagnóstico y las medidas de eliminación y control contra la paratuberculosis en bovinos lecheros. Esta información permitirá a los Médicos Veterinarios decidir las mejores estrategias para diagnosticar y controlar esta enfermedad que perjudica silenciosamente la rentabilidad de la ganadería lechera y que además podría ser potencialmente zoonótica.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades de la paratuberculosis bovina

La paratuberculosis bovina es una enfermedad de distribución mundial y de gran impacto económico para los ganaderos. Se considera que la mayoría de bovinos infectados, alrededor del 95%, están en la etapa subclínica de la infección, con menos del 5% de los bovinos infectados exhibiendo signos clínicos (Magombedze *et al.*, 2013; Fecteau, 2017) ya que la principal característica de esta enfermedad es su largo período de incubación que conduce a una retardada diseminación vía fecal del agente causal, y una respuesta humoral también retardada en los animales infectados (Bauerfeind *et al.*, 2016).

Esta enfermedad produce una enteritis crónica debilitante en animales adultos, que conduce a una progresiva emaciación y posterior muerte de los animales afectados (Prieto, 2012; Yoo y Shin, 2012). La infección es progresiva y muestra cuatro etapas de desarrollo: silente, subclínica, clínica y avanzada (Fecteau, 2017). El término “enfermedad de Johne” es utilizado frecuentemente para referirse al síndrome clínico de diarrea y pérdida de peso que resulta de la infección con el agente causal (Sweeney, 2015).

Se ha determinado que la paratuberculosis afecta un amplio rango de especies rumiantes además de los bovinos, incluyendo ovinos, caprinos, llamas, alpacas, camellos, alces, ciervos, jirafas y búfalos, que son infectados naturalmente exhibiendo diarreas de variada intensidad (Gautam *et al.*, 2018). Prieto (2012) reporta que, en la zona de Asturias, España, se ha determinado la presencia de paratuberculosis en animales silvestres tales como jabalíes, venados y gamos, rumiantes silvestres que tienen contacto con bovinos al pastoreo.

La infección también ha sido reportada en especies no rumiantes incluyendo conejos, gatos, zorros, comadreas, tejones, mapaches, ratones y ratas, que usualmente no exhiben los signos clínicos clásicos de paratuberculosis (Carta *et al.*, 2013). Shaughnessy *et al.* (2013) demostraron la presencia de paratuberculosis en conejos silvestres europeos (*Oryctolagus cuniculus*)

aparentemente saludables, especie que tiene mucha presencia en las zonas de crianza de bovinos de carne en el este de Escocia. De 281 conejos analizados, el 23.8% fue positivo para *M. avium paratuberculosis* mediante cultivo o la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Por otro lado, la infección ha sido descrita en algunas aves silvestres, en primates no humanos y se sospecha que puede estar relacionada a la enfermedad de Crohn en los humanos (Yoo y Shin, 2012; Sweeney, 2015). Además, los equinos y perros pueden ser infectados experimentalmente (Geetha y Palanivel, 2017).

2.1.1. Epidemiología

La paratuberculosis está presente en todos los países que crían bovinos. Se piensa que esta extensa diseminación ocurrió por la importación de bovinos aparentemente normales pero infectados subclínicamente (Constable *et al.*, 2017; Peek *et al.*, 2018) que ingresaron a zonas libres de la infección debido a la falta de regulación sanitaria, lo que permitió que el ganadero tomara las decisiones de manejo de los animales y la enfermedad, en ese momento no conocida (Beaunée *et al.*, 2017). Un estudio histórico realizado por Momotani (2012) describe que el primer caso de paratuberculosis en Japón fue registrado en un bovino de raza Shorthorn importado de Inglaterra en 1930. Posteriormente, también se registraron casos en bovinos Holstein importados desde Estados Unidos alrededor de la década de 1960 y unas décadas después, se observaron brotes de la enfermedad en los años 80 en la raza local Japonés Negra en diversas localidades del país, confirmando la diseminación de paratuberculosis a partir de la importación de bovinos. En Perú, una publicación realizada por Ramos *et al.*, en el año 1953, da cuenta de la presencia de un caso de paratuberculosis bovina, en una vaca importada de Holanda, que presentaba diarrea profusa, el trabajo se intitulaba “La paratuberculosis bovina (enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa): nueva enfermedad hallada en el ganado lechero en el Perú”. Por su antigüedad, dicha bibliografía no es accesible en estos momentos.

Igualmente, la paratuberculosis es esencialmente un problema endémico. La incidencia es mayor en animales de crianza intensiva y se observa principalmente en bovinos lecheros debido a que éstos suelen mantenerse por muchos años dentro del hato, permitiendo la observación de casos clínicos (Fecteau, 2017). Se ha reportado que las razas bovinas lecheras Jersey, Guernsey y la raza de carne Limousin son más susceptibles a la paratuberculosis que otras razas bovinas (Scott *et al.*, 2011).

La tasa de mortalidad de la infección está alrededor del 1%. Esto es debido a que los animales son separados del hato por disminución de la producción láctea, fallas reproductivas o porque el animal se va debilitando y no se reporta que es eliminado por paratuberculosis (McKenna *et al.*, 2006; Gwozdz, 2010; Scott *et al.*, 2011).

Diversos estudios indican que sólo 10 a 15% de los animales infectados desarrolla la enfermedad clínica (EFSA, 2017). Se estima que por cada caso clínico avanzado de paratuberculosis hay 15 a 25 animales afectados con las otras etapas de la infección: 1 a 2 casos con signos clínicos leves, 4 a 8 casos de portadores adultos con infección subclínica y 10 a 14 bovinos con infección silente (Magombedze *et al.*, 2013; Constable *et al.*, 2017). Magombedze *et al.* (2013) elaboraron un modelo matemático para predecir la cantidad de casos en las diferentes etapas de la enfermedad, descrita como el “fenómeno iceberg”, en el cual los animales que presentan signos clínicos son solamente la punta del iceberg. Es decir, la parte visible del problema es mínima, mientras que la parte invisible está compuesta por la mayoría de casos, que están en la fase silente y subclínica, y que generalmente no son detectados por el productor (figura 1).



Figura 1. El “fenómeno iceberg” en el desarrollo de la paratuberculosis bovina

Fuente: Magombedze *et al.* (2013)

La prevalencia de paratuberculosis es difícil de determinar en una región o país, debido a la falta de reporte de casos clínicos confirmados a las autoridades sanitarias, la baja sensibilidad de las pruebas diagnósticas disponibles para los animales en fase subclínica, y porque los casos clínicos son descartados antes de un diagnóstico definitivo (Peek *et al.*, 2018). En Estados Unidos, al menos 68% de los bovinos lecheros están infectados con *M. avium paratuberculosis*, pero tienen una prevalencia mucho menor en bovinos de carne, alrededor de 10%. Asimismo, se ha determinado que la prevalencia entre hatos va desde 0% hasta 27.3%, con un promedio de 5.5%; la alta prevalencia dentro del hato está asociada con una mayor diseminación fecal de *M. avium paratuberculosis* por los animales positivos (Fecteau, 2017).

Asimismo, es complicado comparar los diferentes reportes de prevalencia debido a la variedad de pruebas diagnósticas utilizadas para su determinación (Yoo y Shin, 2013). Por ejemplo, en la región de Bengala Occidental, India,

Bhutediya *et al.* (2017) determinaron la prevalencia de paratuberculosis en 191 bovinos lecheros utilizando las pruebas de reacción intradérmica e inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA), hallando 29.8% y 37.7% de animales positivos, respectivamente, mientras que Garg *et al.* (2015) también en India, reportan prevalencias entre 14.4% y 16.3% utilizando las pruebas PCR y ELISA, respectivamente, en leche de 355 bovinos de hatos lecheros pertenecientes a la localidad de Punyab, al noreste del país.

En el año 2017, la Autoridad Europea de Seguridad Alimenticia (EFSA, por sus siglas en inglés) recopiló datos de las prevalencias reales de paratuberculosis a nivel mundial y el tipo de técnica diagnóstica que se utilizó para determinar dicha prevalencia (cuadro 1). Muchos de estos reportes son de la década pasada, cuando se comenzó a resaltar la importancia de la enfermedad.

Cuadro 1. Prevalencias de paratuberculosis bovina reportadas a nivel mundial.

País	Tipo de prueba	Número de bovinos	Prevalencia	Año de reporte
Austria	ELISA	11,028	47%	1999
Bélgica	ELISA	13,317	0.87%	2000
Francia	ELISA	8,793	22%	2001
Alemania	ELISA	3,454	31%	2005
Italia	ELISA	27,135	17%	2003
Noruega	ELISA	9,456	83%	2003
Irlanda	ELISA,	246 bovinos	19%	2002
	cultivo fecal	importados		
Eslovenia	ELISA	11,513	0.41%	2002
España	ELISA	61,069	2.95%	2007
Suecia	Cultivo fecal	4,000	0%	2003
Suiza	PCR	101	19.8%	2006
Países Bajos	ELISA	15,822	2%	2000
Reino Unido	PCR	1,297	3.5%	1996
Grecia	ELISA en	1,200	10%	2014
	leche			
Portugal	ELISA	2,351	1.7%	2004
Turquía	PCR	500	5%	2000
Chipre	ELISA	3,429	24.6%	2011
Canadá	Cultivo tisular	984	16.1%	2004
USA	ELISA	31,745	2.5%	1996
Brasil	ELISA	128	32%	2007

Fuente: EFSA (2017)

En Latinoamérica se han realizado muy pocos estudios sobre la prevalencia de paratuberculosis en bovinos. En Colombia, Benavides *et al.* (2016) realizaron un estudio epidemiológico sobre paratuberculosis en bovinos lecheros de la provincia sureña de Nariño. Para ello, utilizaron suero de 958 vacas mayores de 2 años y provenientes de 16 establos. Las muestras fueron utilizadas en una prueba de ELISA indirecta, que mostró que el 94% de los establos tenía al menos un animal positivo, y 77 bovinos (8%) tenían anticuerpos al agente causal. Igualmente, Jaramillo *et al.* (2017) en Antioquia, zona norte de Colombia, determinaron la prevalencia de esta infección en 83 bovinos lecheros mayores de 2 años utilizando también una prueba de ELISA indirecta y encontrando una seroprevalencia de 17%.

En Brasil, Vilar *et al.* (2015) determinaron la prevalencia de paratuberculosis a nivel de hato y a nivel individual en bovinos procedentes del Estado de Paraíba. Ellos ejecutaron una prueba de ELISA en 2,504 vacas mayores de 2 años, pertenecientes a 480 hatos, obteniendo una prevalencia a nivel de hato de 34.5%. A nivel individual obtuvieron una prevalencia de 10.7%. El trabajo de estos investigadores concluye que la prevalencia a nivel de hato en Paraíba es alta y deben tomar medidas para disminuirla.

En otro contexto, Fiss *et al.* (2015) reportaron la presencia de animales positivos a paratuberculosis en bovinos de carne pertenecientes a la región sur de Rio Grande do Sul, Brasil, al encontrar dos casos de animales con pérdida progresiva de peso y diarrea crónica. Por ese motivo, usaron para cultivo muestras de heces provenientes de 40 animales de un lote de engorde y, además, 34 de esas muestras fueron utilizadas para realizar PCR. Por cultivo no obtuvieron crecimiento del agente patógeno, pero por PCR obtuvieron 5 muestras positivas (14.71%), concluyendo que también es necesario tomar medidas de control contra la paratuberculosis en bovinos de carne de crianza extensiva en Brasil.

En Perú, uno de los primeros reportes sobre paratuberculosis es el realizado por Ortiz *et al.* (2012) que describe el análisis realizado en el año 2008 de un bovino macho adulto de raza Holstein procedente de Lima. El animal estaba aparentemente saludable y se realizó el análisis antes de ser introducido a un

grupo nuevo de animales. Este toro fue positivo a la prueba de ELISA por lo que se decidió realizar un cultivo de heces, saliendo también positivo. Se concluyó que se deben realizar pruebas para diagnosticar paratuberculosis en bovinos machos que serán futuros reproductores para evitar la introducción de la enfermedad en zonas sin infección.

Por otro lado, en el año 2011, Bustamante *et al.* Evaluaron 60 vacas procedentes de tres establos lecheros comerciales de Lima (Huaura, Cañete y Lima) y hallaron un 36.7% de animales positivos utilizando dos pruebas de ELISA y la prueba de reacción intradérmica, confirmando la presencia de paratuberculosis en Lima. Por este motivo, en el año 2012, SENASA implementa el programa de “Caracterización de la Paratuberculosis Bovina en el Perú”, realizando un análisis diagnóstico nacional. Para ello, tomaron muestras de suero de 4,580 bovinos provenientes de 409 crías y utilizaron una prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra *M. avium paratuberculosis*. A nivel nacional, obtuvieron una seroprevalencia de 0.55% \pm 0.21%. En el cuadro que se presenta a continuación (cuadro 2) se presenta la distribución de muestras positivas a anticuerpos contra paratuberculosis por departamento.

Respecto a la paratuberculosis en otros rumiantes domésticos, se ha reportado la infección en zonas donde se crían ovinos y caprinos. En México, Méndez *et al.* (2013) determinaron la presencia de paratuberculosis en caprinos procedentes del municipio de Tecozautla, Hidalgo, en muestras de heces y suero de 139 animales, utilizando la prueba de ELISA, PCR y tinción ácido-resistente. Ellos hallaron 5.04%, 3.6% y 4.32% de animales positivos en cada prueba, respectivamente. Actualmente, Bauman *et al.* (2019) hicieron un estudio en 29 rebaños de cabras y 21 rebaños de ovejas de Ontario, Canadá, utilizando las pruebas de ELISA, PCR y el cultivo de leche y heces, encontrando que solamente un rebaño de cabras y otro de ovejas eran negativos a todas las pruebas utilizadas, es decir, 96.55% y 95.24% de infección a nivel de rebaños, respectivamente. Todos estos estudios demuestran que la paratuberculosis está presente en América y es necesario plantear medidas de control y prevención para evitar la diseminación de la infección.

Cuadro 2. Distribución de los resultados del análisis diagnóstico de paratuberculosis utilizando una prueba de ELISA indirecta en muestras de bovinos en Perú (2012).

Departamento	Muestras totales	Muestras positivas	
		Cantidad	Porcentaje
Amazonas	180	1	0.56
Ancash	240	0	0
Apurímac	289	0	0
Arequipa	184	0	0
Ayacucho	332	1	0.3
Cajamarca	592	1	0.17
Cusco	420	4	0.95
Huancavelica	149	1	0.67
Huánuco	210	2	0.95
Ica	94	0	0
Junín	171	0	0
La Libertad	178	2	1.12
Lambayeque	137	0	0
Lima-Callao	198	7	3.54
Loreto	30	1	3.33
Madre de Dios	81	0	0
Moquegua	51	0	0
Pasco	97	0	0
Piura	172	2	1.16
Puno	464	1	0.22
San Martín	140	1	0.71
Tacna	53	0	0
Tumbes	50	0	0
Ucayali	68	1	1.47
TOTAL	4,580	25	0.55

Fuente: SENASA (2012).

Por otra parte, en Asturias, España, se determinó la prevalencia de paratuberculosis en rumiantes silvestres. En el cuadro 3 se presentan los datos de un reporte realizado en las especies silvestres que tienen contacto con bovinos de leche al pastoreo en Asturias (Prieto, 2012), lo que indica que no sólo otros bovinos o rumiantes domésticos infectados intervienen en la diseminación de la enfermedad. Generalmente en las zonas de pastoreo, los bovinos pueden tener contacto con animales silvestres cuyo estado sanitario no se conoce, por tanto, existe un riesgo de exposición muchas veces no tomado en cuenta por el productor o por las autoridades sanitarias (Carta *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Prevalencia de paratuberculosis en rumiantes silvestres (España).

Especie	Nº de muestras	Prevalencia
Jabalí	105	1.9%
Venado	69	2.89%
Gamo	96	31.25%

Fuente: Prieto (2012).

Los factores que pueden precipitar la enfermedad clínica incluyen eventos relacionados a estrés tales como el parto, estación reproductiva, transporte, nutrición deficiente, parasitismo y otras enfermedades coexistentes (Scott *et al.*, 2011; Yamasaki *et al.*, 2013). Los puntos críticos para la potencial exposición incluyen las superficies de las maternidades, la ubre de la vaca, el alimento o implementos de alimentación contaminados (Sweeney, 2015). La práctica de mezclar el calostro o la leche para terneros puede ayudar a diseminar la infección desde los adultos infectados hacia muchos terneros en el hato y debería dejar de realizarse. Debido a que el agente causal puede sobrevivir a la pasteurización, el calostro y leche de las vacas infectadas no debe ser utilizada (Fecteau, 2017).

Ya que los terneros de carne se alimentan directamente de su madre desde el nacimiento y por varios meses, hay mayor oportunidad de transmisión de la infección vía calostro y leche, así como a través de la exposición a los bovinos adultos que potencialmente pueden diseminar el agente en la heces (Geetha y Palanivel, 2017). Con los bovinos lecheros, la separación física de los terneros en cunas y áreas alejadas de los corrales de producción reduce el riesgo de transmisión de paratuberculosis en el lote de reemplazo (Constable *et al.*, 2017).

La resistencia a la infección con *M. avium paratuberculosis* se incrementa con la edad del animal, con los neonatos considerados particularmente susceptibles (Lombard, 2011). El mecanismo para la mayor susceptibilidad de los terneros jóvenes tiene algunas posibles explicaciones tales como la presencia de la gotera esofágica en el ternero recién nacido que permite absorber inmunoglobulinas presentes en el calostro y podría representar una barrera

permisiva para las micobacterias, y el sistema inmune inmaduro en comparación con la de los animales adultos (Fecteau, 2017).

Por otro lado, a pesar de que los animales adultos son más resistentes a la infección que los jóvenes, la resistencia natural de los adultos puede llegar a ser superada por la exposición a altas dosis del agente causal. Además, si la infección ocurre en un animal adulto, el prolongado tiempo de incubación puede resultar que el animal sea descartado por otras razones antes que las manifestaciones clínicas de la paratuberculosis sean reconocidas (Nielsen, 2014). La dosis de exposición también influenciará la posibilidad de que el animal sea infectado y la tasa de progreso de la enfermedad. Se piensa que la exposición a altas dosis conduce a una progresión más rápida de la infección y a la manifestación de la enfermedad clínica a una menor edad (Constable *et al.*, 2017). También hay evidencia de factores genéticos pueden desempeñar un papel en la susceptibilidad a la infección (Sweeney, 2015).

Otro factor de riesgo de transmisión es el sistema de manejo del hato. Los bovinos de reemplazo y adultos que son expuestos a forrajes, agua y ambientes extremadamente contaminados pueden infectarse fácilmente. Por otra parte, a menos que dosis masivas y repetidas del agente causal sean consumidas, es probable que la contaminación ambiental y del alimento represente un bajo riesgo para los bovinos adultos, pero puede representar un alto riesgo para los bovinos de reemplazo más jóvenes (Fecteau, 2017; Fernandez-Silva *et al.*, 2017).

2.1.2. Impacto económico de la enfermedad

Las pérdidas económicas de la paratuberculosis se observan principalmente en la industria bovina lechera. Estas pérdidas se originan por la disminución de la producción láctea, disminución de la ganancia de peso en animales de engorde, descarte prematuro en animales adultos, disminución del valor de la

carcasa, reducida fertilidad y el retraso en el mejoramiento genético cuando se descartan animales genéticamente valiosos (García y Shalloo, 2015; Constable *et al.*, 2017; Peek *et al.*, 2018). A las pérdidas debe añadirse los costos del reemplazo de los animales descartados, los gastos de alimentación y tratamiento erróneo (Scott *et al.*, 2011). Conviene subrayar que las pérdidas son difíciles de determinar con exactitud debido a la cantidad de animales con enfermedad subclínica (Prieto, 2012).

Los primeros estudios sobre el impacto económico de la paratuberculosis fueron realizados en la década pasada. Hasonova y Pavlik (2006) indicaron que la industria láctea de Estados Unidos puede estar perdiendo hasta 100 millones de dólares anualmente sumando las pérdidas directas e indirectas de la enfermedad. Las pérdidas económicas directas están relacionadas con la mortalidad de los animales clínicamente enfermos, el menor valor de la carcasa o la condena completa al beneficio; la disminución en la producción láctea y el deterioro de su calidad; la disminución de la tasa de preñez, un incremento de las complicaciones posparto y la reducida fertilidad de las vacas; la conversión alimenticia deficiente, tanto en los animales con enfermedad clínica como subclínica; y los hatos infectados con paratuberculosis tienen una mayor predisposición a presentar enfermedad crónicas (Lombard, 2011; Garcia y Shalloo, 2015).

En términos generales, las pérdidas económicas indirectas incluyen la pérdida de las futuras crías de los animales prematuramente descartados, el aumento en los costos de producción, los costos para las pruebas diagnósticas, el gasto en el tratamiento veterinario infructuoso en los animales clínicamente enfermos al creer que se trata de otra enfermedad, la pérdida del valor genético y las pérdidas asociadas con restricciones para comercializar productos que provienen de hatos con paratuberculosis (Hasonova y Pavlik, 2006; Smith *et al.*, 2017).

En Estados Unidos se han realizado diversas investigaciones para determinar el impacto económico de la paratuberculosis bovina. Por ejemplo, Bhattarai *et al.* (2013) realizaron un estudio en operaciones de bovinos de carne hallando que hay una pérdida anual de \$250 por cada animal infectado, con un rango que

puede ir desde \$82 a \$486 por animal. Su estudio también estimó que la pérdida anual promedio en un hato de 100 vacas lecheras con una prevalencia de 7% puede llegar a \$1747, con un rango de \$625 hasta \$3250.

En Australia, Shephard *et al.* (2016) encontraron que los casos clínicos de paratuberculosis pueden llegar a costar hasta \$1895 anualmente en el año de descarte y una pérdida promedio de \$221 en el año previo al descarte, dando una pérdida total de \$2116. Teniendo en cuenta que el tamaño promedio de un hato lechero en Australia es de 262 vacas y reportando 4.7 casos clínicos por hato, las pérdidas anuales por paratuberculosis se estimaron en \$11748. Por el contrario, Barratt *et al.* (2018) destaca la disminución de pérdidas económicas en hatos que ejecutan medidas rutinarias de control de paratuberculosis. En Reino Unido, los costos atribuidos a la paratuberculosis llegan a \$29 por bovino lechero al año, y son más bajos en bovinos de carne, con un costo estimado de \$10 a \$20 por animal.

2.1.3. Potencial zoonótico de la enfermedad

Los últimos avances en la tecnología diagnóstica han descubierto una posible asociación entre la paratuberculosis y la enfermedad de Crohn en los humanos. La enfermedad de Crohn afecta el tracto gastrointestinal, la persona se presenta con dolor abdominal, diarrea crónica, pérdida de peso y fatiga. No se ha determinado un patógeno causal específico y se cree que resulta de la interacción de factores genéticos, ambientales y la microflora intestinal, que resulta en una respuesta inmune anormal de la mucosa y el compromiso de la función de la barrera epitelial intestinal (Torres *et al.*, 2017).

En algunas personas con enfermedad de Crohn, *M. avium paratuberculosis* ha sido hallado por cultivos y análisis molecular, aunque no en todos los casos. Sin embargo, también ha sido aislado, aunque raramente, de personas saludables y de personas con otras enfermedades (Bauerfeind *et al.*, 2016). Si bien se han hallado muchas similitudes entre la patogénesis de ambas enfermedades y la consecuencia final es una enteritis granulomatosa crónica en

ambos casos, aún falta realizar estudios a gran escala para determinar que dicha relación existe (Prieto, 2012; Yoo y Shin, 2012).

Los investigadores sospechan que *M. avium paratuberculosis* coloniza tejidos pre-dañados en los humanos y puede ser un agente oportunista o sólo un comensal, más que un agente causal primario de la enfermedad de Crohn (Retamal *et al.*, 2011). Tampoco se ha hallado una relación de contaminación a través de los animales ya que las poblaciones con contacto y sin contacto con animales son afectadas similarmente por la enfermedad de Crohn (Bauerfeind *et al.*, 2016).

El único vehículo posible para contraer la micobacteria podría ser el alimento que se obtiene de los animales infectados, pero no hay evidencia de que el patógeno esté presente en los alimentos cárnicos, mientras que, si ha sido hallado en leche cruda, en bajas cantidades en leche pasteurizada, y en leche tratada con altas temperaturas (Barletta y Steffen, 2013; Fecteau, 2017). Faria *et al.* (2014) hallaron la presencia de ADN de *M. avium paratuberculosis* en un 10% de muestras tomadas de 30 quesos artesanales Coalho en Brasil, y además recuperaron material viable mediante el cultivo de estas muestras, concluyendo que el queso artesanal Coalho de Brasil puede ser un riesgo para la salud de individuos susceptibles.

Por otro lado, Paolicchi *et al.* (2012) reportaron el aislamiento de este patógeno en leche pasteurizada y ultra pasteurizada de comercios de Buenos Aires, Argentina. Ellos sometieron 70 muestras de leche a una prueba de PCR, hallando 2.86% de muestras positivas a *M. avium paratuberculosis*. Igualmente, Gerrard *et al.* (2018) llevaron a cabo un muestreo en leche pasteurizada comercializada en los condados de Nottinghamshire, Derbyshire y Leicestershire, Reino Unido, encontrando que un 10.3% de 368 muestras contenían el patógeno viable, confirmando que la pasteurización no es capaz de eliminar completamente la exposición humana a *M. avium paratuberculosis* a través de la leche.

2.1.4. Fisiopatología de la enfermedad

Después de la ingestión, *M. avium paratuberculosis* utiliza el íleon como puerta de ingreso y además puede localizarse dentro del tejido linfoide asociado al intestino. Se piensa que las células M de las placas de Peyer tienen un papel principal en la captación del patógeno desde el lumen intestinal (Gelberg, 2017; Zachary, 2017). Luego de ser capturadas por éstas, las micobacterias son liberadas en el lado submucoso del epitelio intestinal donde son fagocitadas por los macrófagos y llevadas a los nódulos linfáticos adyacentes, sin embargo, no son destruidas, ya que tienen la habilidad de sobrevivir dentro de los macrófagos y multiplicarse intracelularmente evitando la maduración y acidificación de la vacuola fagocítica (Scott *et al.*, 2011; Sweeney, 2015).

Desde este punto, la progresión de la infección es determinada por un balance de la respuesta inmune e innata del hospedero y la habilidad del agente causal para evadir la destrucción (Gelberg, 2017; Zachary, 2017). Por lo tanto, luego de la invasión, la infección puede seguir distintos destinos: el animal puede llegar a ser resistente a la infección y no presentar signos clínicos ni diseminación fecal durante su vida; la infección puede progresar a una etapa intermedia, con infección parcialmente controlada, pero causando una enfermedad subclínica prolongada con diseminación fecal intermitente; o la infección puede progresar hasta causar enfermedad clínica severa con diseminación fecal constante (Scott *et al.*, 2011; Koets y Gröhn, 2015; Peek *et al.*, 2018).

En el caso que la infección no pueda ser eliminada, las micobacterias comienzan a diseminarse a sitios extraintestinales, ya sea vía sanguínea o a través de la linfa. Esto puede resultar en diseminación transplacentaria, y también en la contaminación directa de la leche y calostro (Gwozdz, 2010). Posteriormente, se produce una respuesta inflamatoria que progresivamente conduce a una severa infiltración granulomatosa del intestino, causando alteración y engrosamiento del revestimiento intestinal, con destrucción de las vellosidades y marcada linfangiectasia (Sweeney, 2015; Fecteau, 2017).

La enteritis granulomatosa producida por *M. avium paratuberculosis* resulta en un síndrome de malabsorción, ya que el animal no puede digerir y absorber

los nutrientes que consume. Esta malabsorción conduce a una pérdida proteica que se observa como un edema mandibular, y aparece diarrea, primero intermitente y luego profusa, que se traduce en una pérdida progresiva de peso y el debilitamiento del animal. Finalmente, el cuadro entérico se agrava a tal punto que el animal sufre emaciación grave y muerte (Tiwari *et al.*, 2006).

2.1.5. Fases de la enfermedad

Se mencionan cuatro etapas en el desarrollo de la infección por paratuberculosis: infección silente, enfermedad subclínica, enfermedad clínica y enfermedad clínica avanzada (Constable *et al.*, 2017; Fecteau, 2017). La duración de cada fase depende de la dosis ingerida del patógeno, la potencial contaminación continua del ambiente, la susceptibilidad del hospedero, la severidad de los signos clínicos que se produzcan y la facilidad con la cual la enfermedad pueda ser detectada utilizando los métodos de diagnóstico disponibles (Tiwari *et al.*, 2006; Rathnaiah *et al.*, 2017).

2.1.5.1. Infección silente

La fase de infección silente también conocida como “fase eclipse”, usualmente dura al menos dos años (Fecteau, 2017). Es llamada así porque no hay signos clínicos de la infección, no hay efectos subclínicos medibles de la infección y no hay pruebas diagnósticas económicas para detectar la infección (Tiwari *et al.*, 2006). Los animales en esta etapa generalmente son terneros y bovinos jóvenes muchas veces nacidos de madres con paratuberculosis clínica (Scott *et al.*, 2011). Además, estos terneros mantienen una ganancia de peso y condición corporal normal durante su crecimiento por lo que la enfermedad no se sospecha (Peek *et al.*, 2018).

En esta fase, los animales afectados no tienen anticuerpos séricos detectables y pueden diseminar el organismo, pero de forma intermitente o a un nivel muy bajo que no permite la detección con técnicas de diagnóstico tales como el cultivo o PCR de heces, motivo por el cual algunos animales pueden ser

falsos-negativos en estas pruebas (Barletta y Steffen, 2013; Fecteau, 2017). El único medio de detectar el organismo en esta etapa es demostrando su establecimiento en el tracto gastrointestinal, ya sea por cultivo o histopatológicamente por la observación de microgranulomas en el intestino o nódulos linfáticos regionales, sin embargo, estos procedimientos son muy costosos si son requeridos para varios animales (Tiwari *et al.*, 2006).

Otras pruebas que pueden utilizarse en esta etapa son la prueba de reacción intradérmica y la prueba de interferón gamma, pero hay muchos antígenos comunes entre *M. avium paratuberculosis* y otras micobacterias ambientales, lo que origina una baja especificidad para estas pruebas y, por consiguiente, no eficaces como pruebas rutinarias de análisis (Tiwari *et al.*, 2006). Si bien la sensibilidad de la prueba intradérmica es de 54% y su especificidad es de 79%, será eficaz para determinar que los animales negativos están libres de todo tipo de micobacterias (Gilardoni *et al.*, 2012). La prueba de interferón gamma aún se encuentra en investigación (Munir *et al.*, 2014).

2.1.5.2. Enfermedad subclínica

En la segunda etapa de la infección los animales portadores no muestran signos clínicos específicos a paratuberculosis, pero pueden estar afectados por otros procesos infecciosos tales como mastitis, puede disminuir levemente la producción láctea y observarse una reducida fertilidad en comparación con sus compañeras de hato no infectadas (Yamasaki *et al.*, 2013). Respecto a la mayor frecuencia de mastitis en bovinos con paratuberculosis, es posible que el desafío crónico y continuo del sistema inmune cause una reducida respuesta frente a otros patógenos (García y Shalloo, 2015). Las causas de la menor producción láctea y reducida fertilidad pueden estar relacionadas a un balance energético negativo en el animal debido a la menor absorción de nutrientes (Hasonova y Pavlik, 2006).

En esta fase de la infección, los animales afectados suelen tener lesiones inflamatorias granulomatosas focales, variables tasas de progresión de la enfermedad y comienzan a producir una mayor cantidad de micobacterias,

aunque la dilución del patógeno en grandes volúmenes de contenido intestinal puede resultar en una diseminación fecal intermitente, que no siempre puede ser detectada por el cultivo o PCR en heces (Tiwari *et al.*, 2006). Además de la progresión de la infección intestinal con la formación de granulomas, en esta fase puede comenzar la diseminación de micobacterias hacia otros órganos tales como el útero y la glándula mamaria (Fecteau, 2017).

También, dependiendo de la progresión de la enfermedad, los bovinos afectados pueden tener una incrementada respuesta celular con producción de interferón gamma y una limitada respuesta de anticuerpos (Fecteau, 2017). Es posible que un evento estresante origine la abundante multiplicación de las micobacterias, estimule la respuesta de anticuerpos y disminuya la respuesta inmune celular, en especial cuando el animal afectado está más cerca de ingresar a la fase clínica (Rathnaiah *et al.*, 2017). Por tanto, se sugiere hacer un seguimiento y análisis de los registros productivos y reproductivos de los animales, en especial después de un evento tan estresante como el parto, para detectar animales que disminuyen su producción láctea o pierden peso sin razón aparente, y mediante pruebas serológicas determinar si son positivos a *M. avium paratuberculosis*.

2.1.5.3. Enfermedad clínica

Debido al extenso período de incubación de la infección, los casos clínicos pueden verse en animales adultos con edades entre 2 y 6 años, y se presentan esporádicamente debido a la lenta diseminación de la enfermedad. (Peek *et al.*, 2018). La presentación parece estar ligada a un parto reciente, con disminución marcada de la producción láctea (Scott *et al.*, 2011). El signo más notable es la progresiva pérdida de peso y condición corporal a pesar de que el animal no pierde el apetito (figura 2) (Gwozdz, 2010). Igualmente, se desarrolla una diarrea con heces blandas a acuosas, sin olor ofensivo, sin presencia de sangre, restos epiteliales o moco (Gelberg, 2017). No hay fiebre o toxemia, la actividad ruminal permanece normal, aunque el animal puede tener polidipsia (Scott *et al.*, 2011).

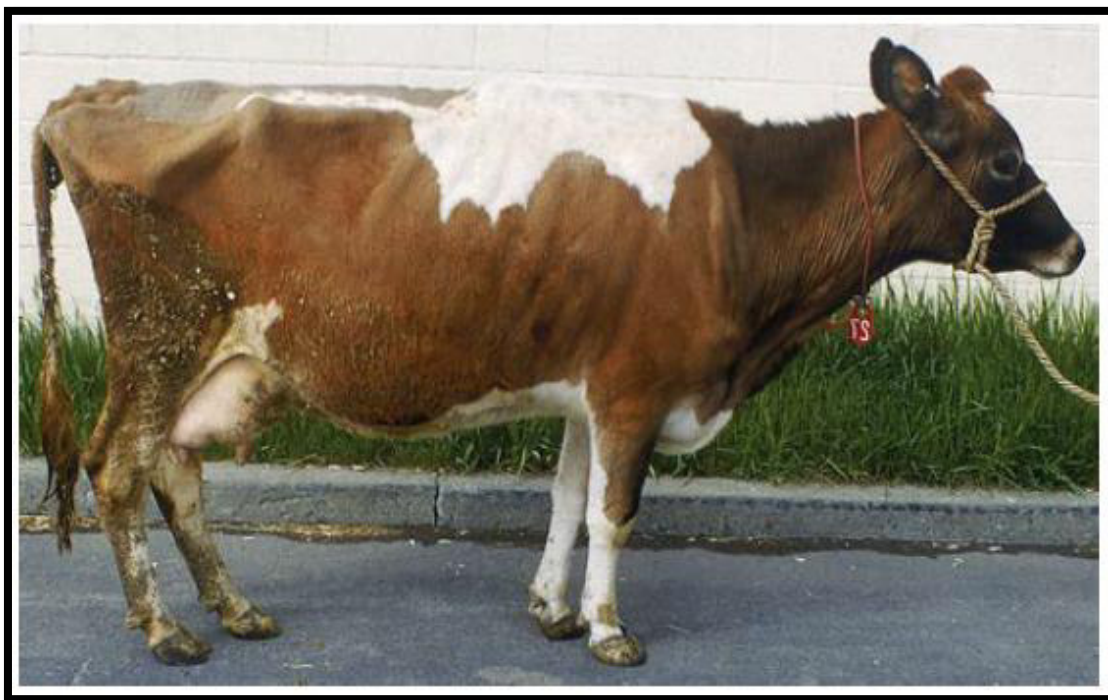


Figura 2. Pérdida de la condición corporal en un bovino con paratuberculosis

Fuente: Peek *et al.* (2018)

Esta etapa puede desarrollarse en un período de 3 a 6 meses y, prácticamente, todos los animales son positivos a *M. avium paratuberculosis* por PCR o cultivo de heces y tienen anticuerpos detectables por la prueba de ELISA o la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDAG) (Fecteau, 2017) aunque también se puede aplicar un diagnóstico presuntivo en base a los signos clínicos (Eamens *et al.*, 2015). Sin embargo, Smith *et al.* (2017) indican que es posible que pocos animales sean hallados en esta etapa de la enfermedad debido a que son descartados a causa de la reducida producción láctea y fallas reproductivas.

2.1.5.4. Enfermedad clínica avanzada

Según la enfermedad avanza, la emaciación es evidente, el animal se aletarga, desarrolla edema submandibular, la diarrea se hace más severa y se

presenta como un fluido que sale a “chorros” (Constable *et al.*, 2017). El edema submandibular, también llamado “mandíbula en botella” es característico en esta fase, secundario a la hipoproteinemia (figura 3) (Jesse *et al.*, 2016).



Figura 3. Edema mandibular en un bovino con paratuberculosis avanzada

Fuente: Jesse *et al.* (2016)

Los animales pueden desarrollar rápidamente esta etapa, algunas veces en unas pocas semanas, pero es típica una progresión más gradual (Fecteau, 2017). Si el animal no es descartado en este punto, progresará hasta la etapa final de la enfermedad de Johne, con inapetencia, deshidratación, anemia, caquexia y posteriormente la muerte (Gwozdz, 2010; Sweeney, 2015).

Como en el caso anterior, ver animales en esta fase es extremadamente raro pues suelen ser descartados en la fase clínica inicial (Tiwari *et al.*, 2006). Asimismo, la respuesta inmune es predominantemente humoral, similar o incluso más fuerte que en la etapa anterior, por tanto, los animales en esta etapa podrían ser detectados por diagnóstico clínico, cultivo, PCR, ELISA y todas aquellas pruebas que detecten anticuerpos (Wadhwa *et al.*, 2013). Por otra parte, Roussey *et al.* (2014) indican que algunos animales en fase clínica avanzada pueden no responder inmunológicamente, manteniéndose en un estado de

anergia. Por lo tanto, es posible que un animal con los signos clínicos característicos de paratuberculosis avanzada salga negativo a la serología, por lo que se recomienda no tener en cuenta sólo la serología como prueba diagnóstica definitiva y dar más importancia a los signos clínicos.

2.2. *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

M. avium paratuberculosis es una micobacteria aerobia, intracelular, facultativa, oxidativa, que no forma esporas, no es móvil, tiene una forma bacilar ancha y usualmente es menor de 2 µm de longitud, con características ácido-resistentes (Quinn *et al.*, 2016). Se han descrito tres cepas: la cepa I hallada en ovinos, la cepa II hallada en bovinos y la cepa III, también llamada intermedia (Geetha y Palanivel, 2017). Esta micobacteria también tiene la habilidad de sobrevivir dentro de los macrófagos (Fecteau, 2017). Existen muchas especies de micobacterias a nivel mundial y que infectan múltiples especies animales, causando diversas enfermedades (cuadro 4). Además, en el ambiente pueden estar presentes micobacterias saprofitas (Markey *et al.*, 2013).

Cuadro 4. Micobacterias presentes en animales y el hombre

I. Complejo <i>M. tuberculosis</i> de lento crecimiento		
Especie	Hospederos	Enfermedad
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos, primates, caninos, bovinos, psitácidas, canarios	Tuberculosis humana
<i>M. africanum</i>	Humanos	Tuberculosis humana
<i>M. canettii</i>	Humanos	Tuberculosis humana
<i>M. bovis</i>	Bovinos, ciervos, tejones, zarigüeyas, humanos, felinos, otras especies de mamíferos	Tuberculosis bovina
<i>M. caprae</i>	Caprinos, bovinos, ocasionalmente ovinos, porcinos, jabalíes	Tuberculosis caprina

<i>M. microti</i>	Campañoles (roedores), ocasionalmente en conejos, cuyes y terneros	Tuberculosis murina
<i>M. pinnipedii</i>	Focas, leones marinos, ocasionalmente otros mamíferos incluyendo al hombre	Tuberculosis de los pinnípedos

II. Micobacterias no cromógenas de lento crecimiento

	Aves domésticas y silvestres	Tuberculosis aviar
Complejo <i>M. avium</i>	Porcinos	Lesiones tuberculosas intestinales
	Equinos, porcinos	Tuberculosis raramente
	Aves domésticas y silvestres	Tuberculosis aviar
<i>M. intracellulare</i>	Porcinos y bovinos	Tuberculosis en nódulos linfáticos intestinales
	Primates no humanos	Enteritis granulomatosa
<i>M. ulcerans</i>	Felinos	Lesiones cutáneas nódulo- ulcerativas
	Felinos	Lesiones cutáneas nódulo- ulcerativas
<i>M. xenopi</i>	Porcinos	Lesiones tuberculosas en nódulos linfáticos del tracto digestivo

III. Micobacterias fotocromógenas de lento crecimiento

<i>M. kansasii</i>	Venados, porcinos y bovinos	Enfermedad tipo tuberculosis en pulmones y nódulos linfáticos
<i>M. simiae</i>	Humanos y monos	Enfermedad pulmonar en el hombre, pero no en los monos
<i>M. marinum</i>	Peces marinos, mamíferos acuáticos y anfibios	Tuberculosis de los peces, granulomatosa y diseminada
<i>M. vaccae</i>	Saprofítica	No causa enfermedad

IV. Micobacterias escotocromógenas (pigmentación en ausencia de luz) de lento crecimiento

<i>M. scrofulaceum</i>	Porcinos domésticos y silvestres, bovinos y búfalos	Lesiones tipo tuberculosis en nódulos linfáticos cervicales e intestinales
------------------------	---	--

V. Micobacterias de rápido crecimiento

	Peces	Lesiones granulomatosas diseminadas
	Tortugas	Lesiones tipo tuberculosis en pulmones
<i>M. chelonae</i>	Bovinos	Lesiones granulomatosas en nódulos linfáticos
	Manatíes, felinos y porcinos	Abscesos y lesiones nódulo-ulcerativas en varios tejidos
	Monos	Abscesos en nódulos linfáticos o enfermedad diseminada
	Bovinos	Lesiones granulomatosas en nódulos linfáticos y glándula mamaria
<i>M. fortuitum</i>	Felinos	Lesiones ulcerativas piogranulomatosas en piel
	Caninos	Lesiones granulomatosas en piel y pulmones
	Porcinos	Granulomas en nódulos linfáticos, articulaciones y pulmones
<i>M. phlei</i>	Felinos	Lesiones nódulo-ulcerativas en piel
	Bovinos	Mastitis granulomatosa
<i>M. smegmatis</i>	Felinos	Lesiones ulcerativas cutáneas

VI. Otras micobacterias

<i>M. avium paratuberculosis</i>	Bovinos, ovinos, caprinos y otros rumiantes	Paratuberculosis
----------------------------------	---	------------------

<i>M. lepraemurium</i>	Felinos y roedores	Lepra felina y murina, respectivamente
<i>M. leprae</i>	Humanos y armadillo de nueve bandas	Lepra en humanos y replicación en armadillos

VII. Micobacterias no identificadas

Micobacteria ácido-resistente	Bovinos	Tuberculosis cutánea, linfangitis
-------------------------------	---------	-----------------------------------

Fuente: Markey *et al.* (2013), Quinn *et al.* (2016).

En general, las micobacterias son resistentes a las influencias físicas, pueden mantenerse viables en el suelo y partículas secas de heces por muchos meses y pueden persistir por hasta un año en las pasturas (Scott *et al.*, 2011). Asimismo, son capaces de formar una bioforma parecida a una espora que es resistente al tratamiento de calor *in vitro*, lo cual explica la habilidad de este microorganismo para sobrevivir la pasteurización (Sweeney, 2015; Geetha y Palanivel, 2017).

En el año 2005, Li *et al.* describieron la secuencia genómica completa de la cepa K-10 de *M. avium paratuberculosis*, una cepa que afecta bovinos. El genoma consiste en un solo cromosoma circular de 4 829,781 pares de bases y codifica 4,350 marcos abiertos de lectura, 45 ARN de transferencia y un operón de ARN ribosómico (figura 4).

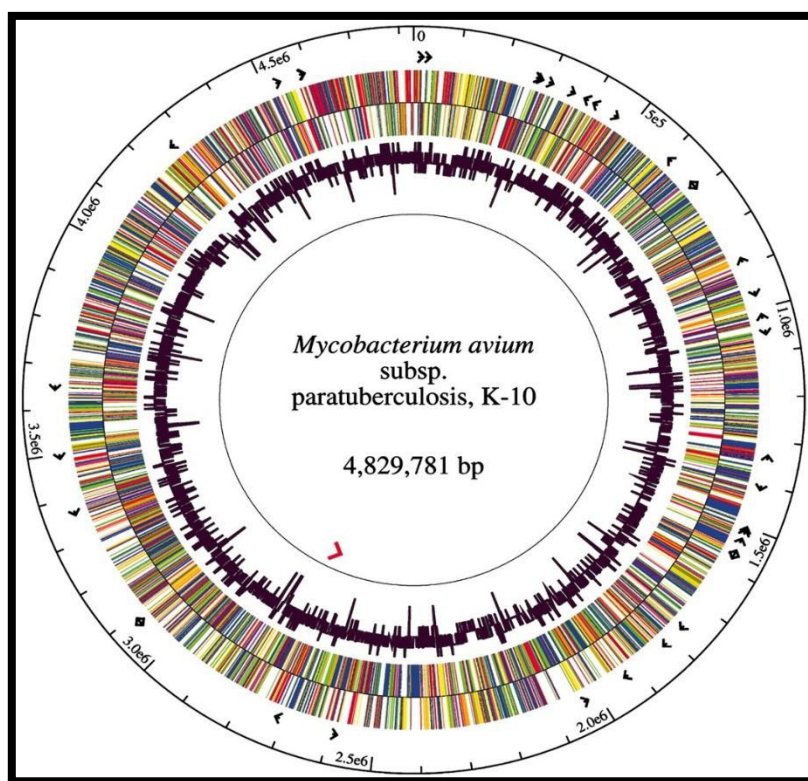


Figura 4. Genoma de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

Fuente: Li *et al.* (2005).

2.2.1. Transmisión y fuentes de infección del agente

La principal ruta de infección de la paratuberculosis entre los animales es la vía oral, por la contaminación fecal del alimento y agua. Los terneros pueden infectarse por la contaminación de la piel de la ubre de la vaca (Scott *et al.*, 2011). Los animales que diseminan las micobacterias usualmente son los adultos y el patógeno es ingerido por animales susceptibles, usualmente terneros y bovinos jóvenes (Sweeney, 2015). El suelo, el alimento, incluyendo las pasturas, el agua de bebida y cualquier lugar en contacto con excrementos infectados puede llegar a ser una fuente secundaria de contaminación (Geetha y Palanivel, 2017).

La presencia de pequeñas cantidades de estiércol de animales que diseminan grandes cantidades del patógeno puede originar una vasta contaminación y exposición de los animales susceptibles. Se ha demostrado que las micobacterias pueden ser aerosolizadas y diseminadas con el polvo creando

la posibilidad de exposición a través de la inhalación (Lombard, 2011). Este patógeno también puede ser diseminado directamente a través del calostro o la leche de las vacas infectadas y ha sido hallado en el semen (Fecteau, 2017).

2.2.2. Respuesta inmunológica frente al agente

Diversos estudios han propuesto que la patogénesis de la paratuberculosis bovina involucra dos tipos de respuesta inmune: inicialmente una respuesta celular, mediada por interferón gamma y, posteriormente, una respuesta humoral, mediada por anticuerpos (Wadhwa *et al.*, 2013; Koets y Gröhn, 2015). Según progresa la enfermedad, se observará una respuesta inicial hiperreactiva, una respuesta mediada por células B, y una fase anérgica, que deben tenerse en cuenta en el momento de aplicar las técnicas diagnósticas (Roussey *et al.*, 2014; OIE, 2018).

La inmunidad mediada por células generalmente es detectada en los animales resistentes, pero es débil en los casos clínicos. Inversamente, la respuesta de anticuerpos es pobre en los animales resistentes y durante las etapas iniciales de la enfermedad, pero es fuerte durante la fase clínica. Además, en la etapa final de la enfermedad el animal puede mostrar una respuesta inmune leve, llamada anergia (Scott *et al.*, 2011). Según Roussey *et al.* (2014), en el transcurso de la infección se desarrolla una población de células T reguladoras en respuesta a la estimulación crónica leve por las micobacterias, los linfocitos CD4⁺CD25⁻, que son capaces de responder inmunológicamente en la fase subclínica de la enfermedad pero que ya no responden en la fase clínica. Su estudio sugiere que en la fase clínica estos linfocitos no pueden regular el uso de ARN mensajero que codifica algunas interleucinas, conduciendo a la anergia.

2.2.2.1. Inmunidad celular

Inicialmente, cuando *M. avium paratuberculosis* ingresa al hospedero, es capturado por las células M ubicadas en las placas de Peyer, que lo llevan a la submucosa intestinal donde es fagocitado por los macrófagos. Estos macrófagos

son transportados vía linfática hacia los nódulos linfáticos regionales donde presentan el antígeno a las células T (linfocitos helper) para iniciar la liberación de citoquinas tales como interleucina 2 (IL-2) (De Juan, 2005). IL-2 produce la clonación de linfocitos CD4+ que producen interferón gamma, factor de necrosis tumoral y factores de estimulación de granulocitos y macrófagos (Koets y Gröhn, 2015).

En este momento, las citoquinas liberadas atraen más macrófagos que pueden ser capaces de limitar la proliferación de micobacterias, la expansión de la infección, y quizás eliminar completamente al patógeno. En los animales que no pueden eliminar el patógeno, la infección es mantenida bajo control por el sistema inmune celular, limitando su progresión, sin embargo, esto tiene un costo para el hospedero, y la persistente presencia del antígeno de las micobacterias en el tejido intestinal y linfoide asociado al intestino incita una respuesta inflamatoria crónica iniciando la formación de los granulomas (Olsen *et al.*, 2010; Boes y Durham, 2017).

2.2.2.2. Inmunidad humoral

Eventualmente, la respuesta inmune celular ya no es capaz de contener la infección. La respuesta celular Th1 previamente eficaz es reemplazada por el desarrollo de una respuesta mediante linfocitos CD4+ Th2 con la producción de citoquinas tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que están asociadas con la producción de anticuerpos y disminución de la inmunidad mediada por células (Sweeney, 2015). Wadhwa *et al.* (2013) indican que una proporción de macrófagos queda persistentemente infectada y secreta IL-10, que produce la reducción de interferón gamma a través de la supresión de las células CD4+. Esto resulta en la estimulación de la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos (De Juan, 2005). En la figura 5 se puede observar una representación esquemática de las complejas interacciones entre *M. avium paratuberculosis* y el sistema inmune del hospedero.

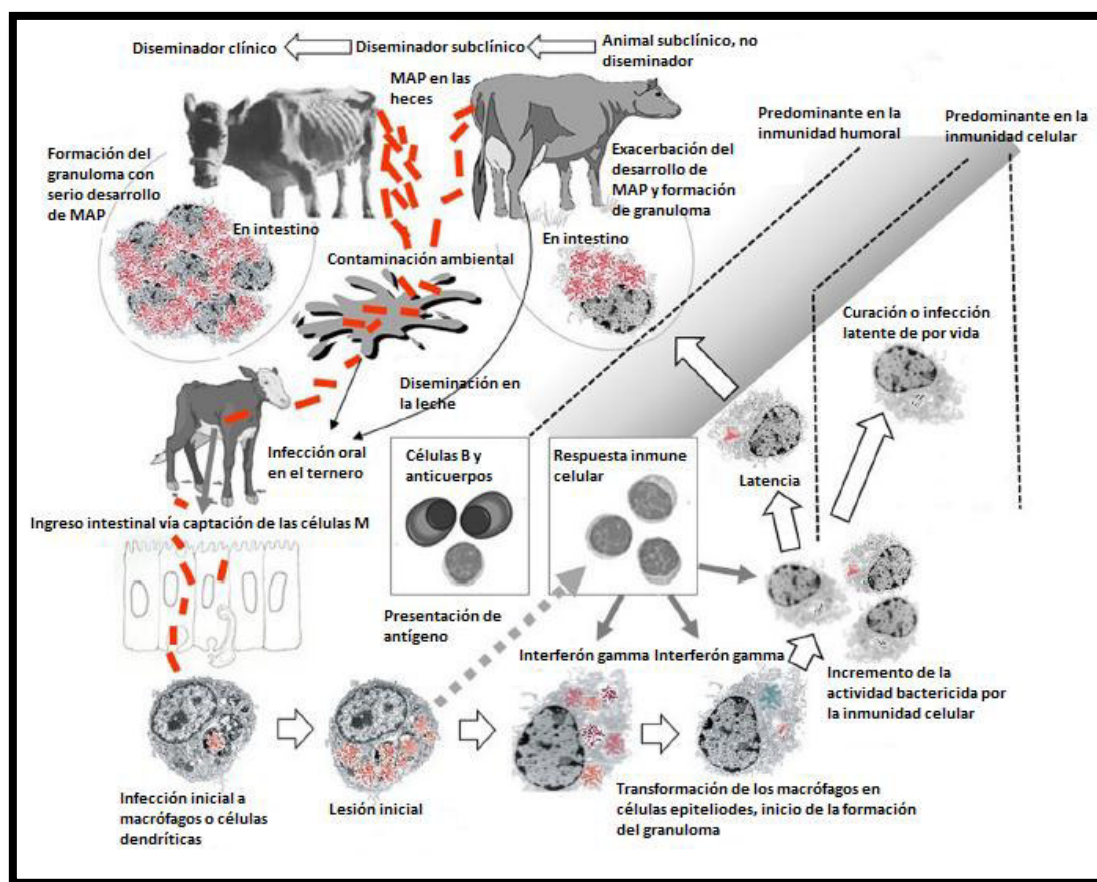


Figura 5. Representación esquemática del desarrollo de inmunidad en la paratuberculosis bovina.

Fuente: Koets y Gröhn (2015).

A pesar de la creciente producción de anticuerpos, en esta fase la respuesta inmune tampoco es eficaz para contener la infección debido a la presencia de micobacterias intracelulares, protegidas dentro de los granulomas (Wadhwa *et al.*, 2013). Como resultado, continúa la inflamación y se forma un engrosamiento de la pared intestinal, originando la enteritis granulomatosa crónica, que protege a las micobacterias de la respuesta inmune (Zachary, 2017).

2.3. Diagnóstico de paratuberculosis bovina

Uno de los principales retos para controlar y eliminar la paratuberculosis es el diagnóstico, especialmente de los animales en fase subclínica, pues no hay una prueba o técnica que tenga alta sensibilidad y especificidad, que permita de

forma rápida y económica detectar los animales positivos (Prieto, 2012). Generalmente, el diagnóstico presuntivo de paratuberculosis se realiza mediante un examen clínico o a través de una necropsia (OIE, 2018).

En cambio, el diagnóstico definitivo de paratuberculosis es más complejo e incluye una combinación de varios métodos y pruebas tales como las características del cultivo, las pruebas bioquímicas, la inoculación en animales, análisis cromatográficos, pruebas serológicas y técnicas moleculares (Quinn *et al.*, 2016). Varios de estos métodos de diagnóstico son muy laborioso, tal como el cultivo en medio sólido, la cromatografía o la inoculación en animales, y han sido dejados de lado debido a la facilidad y el beneficio económico que ahora brindan las pruebas serológicas y moleculares (Nielsen, 2014).

Actualmente, existen muchas pruebas diagnósticas disponibles comercialmente, cada una de ellas con sus ventajas, desventajas y aplicaciones apropiadas, enfocadas a detectar la presencia y viabilidad del agente causal, o la respuesta inmune celular y humoral que origina. La elección adecuada dependerá de la fase de desarrollo de la enfermedad en que se encuentre el animal afectado (Maroudam *et al.*, 2015).

2.3.1. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico es presuntivo y consiste en la observación de los signos clínicos más específicos tales como la progresiva pérdida de peso y la diarrea intermitente o profusa en un animal con apetito aparentemente normal. También, los casos clínicos usualmente muestran hipoalbuminemia consistente con una condición que causa pérdida proteica (Sweeney, 2015) y en algunos casos puede hallarse una anemia leve (Scott *et al.*, 2011).

Epidemiológicamente, se puede sospechar de paratuberculosis cuando se presenta un caso clínico en animales adultos mayores de 2 años y coincide con un proceso que causa estrés, tal como un parto reciente (Prieto, 2012); también se puede sospechar de paratuberculosis en hatos con historia anterior de la enfermedad, en hatos abiertos que compran animales constantemente, y en

hatos que utilizan prácticas de manejo que pueden favorecer la diseminación de las micobacterias (De Juan, 2005; Mortier *et al.*, 2015).

La principal desventaja del diagnóstico clínico es que no es definitivo porque no confirma la presencia del patógeno en el animal (OIE, 2018), ya que los signos clínicos no son específicos y se presentan en otras enfermedades de los bovinos (Peek *et al.*, 2018). Asimismo, este tipo de diagnóstico se realiza cuando el animal está en la fase clínica de la infección y es muy probable que el bovino afectado lleve diseminando las micobacterias por algún tiempo, originando un ambiente contaminado (Maroudam *et al.*, 2015). Según lo indicado por Magombedze *et al.* (2013), la mayoría de las infecciones deben estar en la etapa subclínica de la enfermedad y los esfuerzos para el diagnóstico deben ser enfocados en esta etapa. En consecuencia, se recomienda que el diagnóstico clínico se complemente con otras técnicas diagnósticas para ser definitivo, tal como cultivo, PCR, frotis de heces o histopatología en casos de necropsia. La serología no se recomienda en la fase clínica avanzada ya que algunos animales pueden estar en fase de anergia.

El diagnóstico diferencial debe incluir enfermedades que causan diarrea crónica en bovinos adultos. La paratuberculosis puede diferenciarse de la salmonelosis y la coccidiosis en que éstas son enfermedades de curso agudo y responden bien a los tratamientos (Peek *et al.*, 2018). Por otro lado, el parasitismo con helmintos gastrointestinales puede causar diarrea de curso agudo o crónico, aunque se observará principalmente en bovinos jóvenes y se diagnosticará rápidamente por la observación de huevos de los parásitos en las heces (Sweeney, 2015).

La deficiencia de cobre, secundaria a una intoxicación por molibdeno puede causar signos clínicos parecidos a la paratuberculosis, pero la diferencia está en que afecta a un mayor número de animales en un área determinada y que responden rápidamente a la administración o suplementación de cobre (Constable *et al.*, 2017). Otras enfermedades que causan emaciación y debilidad con o sin diarrea también deben ser consideradas, incluyendo la malnutrición, reticuloperitonitis crónica, abscesos hepáticos, pielonefritis, linfosarcomas y amiloidosis (Scott *et al.*, 2011).

2.3.2. Diagnóstico anatomo-patológico

El diagnóstico presuntivo también puede ser realizado a través del análisis de necropsia, hallando lesiones intestinales granulomatosas características de la enfermedad, mediante frotis de las lesiones o por histopatología (Nielsen, 2014). Las principales ventajas es que esta técnica es sencilla de ejecutar y las lesiones macroscópicas pueden proporcionar un diagnóstico fiable debido al característico engrosamiento de la pared del intestino delgado, en especial en el íleon y yeyuno, y su asociación con nódulos linfáticos regionales que aparecen tumefactos y edematosos (Prieto, 2012).

Las principales desventajas son las mismas que para el diagnóstico clínico, es decir, generalmente se realiza cuando el animal ha sido sacrificado durante la fase clínica de la enfermedad, y no confirma la presencia de las micobacterias a menos que se realicen técnicas adicionales (OIE, 2018). Por otro lado, la histopatología tiene una baja sensibilidad en las etapas tempranas de la enfermedad cuando la carga de micobacterias es mínima en los tejidos afectados (Gwozdz, 2010).

2.3.2.1. Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas incluyen una enteritis granulomatosa, más la presencia de linfadenitis granulomatosa mesentérica y linfangiectasia. La enteritis granulomatosa está caracterizada por una pared intestinal engrosada, con mayores lesiones en el íleon y la unión ileal-cecal. Se puede hallar un exudado blanco amarillento que indica la infiltración de células inflamatorias granulomatosas (figura 6) (Gelberg, 2017). La linfadenitis granulomatosa mesentérica se caracteriza por nódulos linfáticos mesentéricos aumentados de tamaño con áreas coalescentes y discretas con exudado caseoso blanco amarillento, ocasionalmente mineralizado y que comprime el parénquima contiguo (Zachary, 2017).



Figura 6. Enteritis granulomatosa crónica en el intestino de un bovino. En la parte inferior de la imagen se muestra una porción intestinal normal.

Fuente: Universidad de Wisconsin (2019)

2.3.2.2. Lesiones microscópicas

Las lesiones microscópicas pueden ser focales, multifocales o difusas, según la progresión de la enfermedad. La lesión predominante en el intestino con paratuberculosis es una inflamación granulomatosa con abundante presencia de macrófagos cargados de microorganismos ácido-resistentes (Sweeney, 2015). Los cambios histopatológicos se observan con mayor frecuencia a partir de la fase subclínica, con infiltración granulomatosa multifocal de la lámina propia, pérdida de la arquitectura de las vellosidades intestinales, que se observan severamente engrosadas debido a la inflamación persistente (figura 7) (Begg *et al.*, 2018).

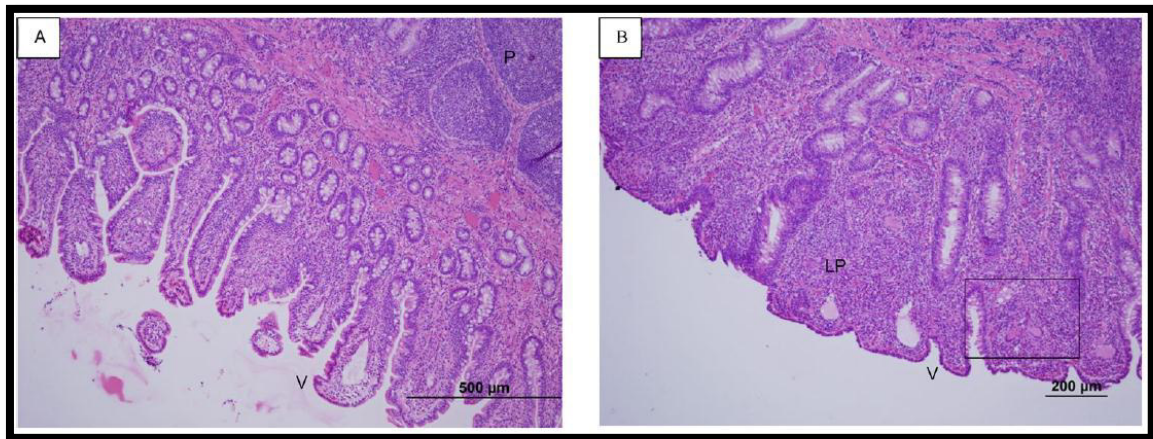


Figura 7. Lesiones microscópicas intestinales en la paratuberculosis bovina. A, intestino normal. B, infiltración granulomatosa de las vellosidades intestinales.

Fuente: Begg *et al.* (2018).

En las lesiones granulomatosas formadas en el íleon se puede observar microorganismos ácido-resistentes dentro de células gigantes (macrófagos transformados en células epitelioides) (figura 8) (Jenvey *et al.*, 2018). También se puede hallar la formación de granulomas en los nódulos linfáticos asociados (Begg *et al.*, 2018).

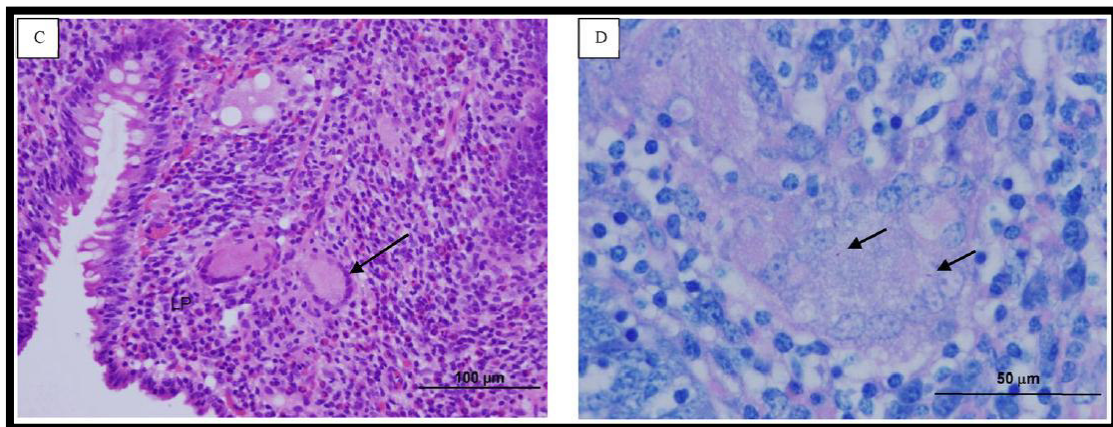


Figura 8. Lesiones microscópicas intestinales en la paratuberculosis bovina. C, aumento del recuadro de la figura 7 (B) mostrando una infiltración granulomatosa. D, microorganismos ácido-resistentes (flechas) dentro de células gigantes.

Fuente: Begg *et al.* (2018).

Según progresa la enfermedad, aparecen lesiones irregulares y multifocales de granulomas a lo largo de todo el íleon e incluso en el yeyuno (figura 9) (Begg *et al.*, 2018). En esta fase se forma el característico engrosamiento de la pared intestinal, observándose una enteritis catarral difusa crónica con hiperplasia de macrófagos, atrofia y fusión de las vellosidades intestinales (Gilardoni *et al.*, 2012).

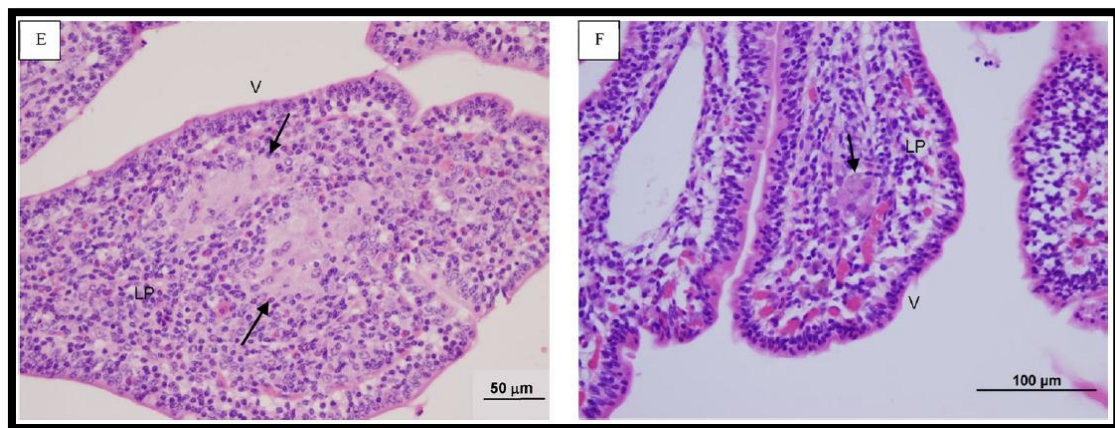


Figura 9. Lesiones microscópicas intestinales en la paratuberculosis bovina. E, lesiones granulomatosas multifocales (flechas). F, infiltración granulomatosa de las vellosidades intestinales (flecha) con engrosamiento de éstas.

Fuente: Begg *et al.* (2018).

Para el análisis histopatológico se deben coleccionar múltiples muestras de la pared intestinal afectada y muestras de los nódulos mesentéricos. Estas muestras deben ser fijadas en formol al 10%, para luego ser teñidas con las tinciones hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen (OIE, 2018).

Se ha considerado al análisis inmunohistoquímico de las preparaciones histológicas, como una técnica basada en la unión específica entre anticuerpos marcados y los antígenos que estos reconocen y se aplica sobre cortes histológicos, en el caso de paratuberculosis se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales frente a *Map* y que pueden dar reacciones cruzadas en caso de infecciones con otras micobacteria, siendo esta técnica más específica que la

tinción de Ziehl-Neelsen, y es especialmente útil en la detección de esferoplastos o cuando la presencia de bacilos es mínima (Sevilla I.2007).

2.3.3. Técnicas para detectar el agente patógeno

El aislamiento e identificación del agente etiológico se considera la técnica de referencia para el diagnóstico, aunque severas limitaciones, tales como una baja cantidad de organismos en las muestras, el crecimiento extremadamente lento y el requerimiento del sideróforo micobactina, han obstaculizado el extenso uso de algunas de estas técnicas (Yoo y Shin, 2012). Las principales técnicas para detectar el agente patógeno son el análisis microscópico, el cultivo y la detección molecular (OIE, 2018).

2.3.3.1. Análisis microscópico

Generalmente se utilizan frotis de heces o de mucosa intestinal teñidos con Ziehl-Neelsen para ser examinados microscópicamente con el objetivo de hallar organismos ácido-resistentes. Para el análisis de heces se recomienda utilizar dos gramos de muestra fecal, moler finamente en un mortero con agua destilada y centrifugar a 4000 revoluciones por minuto por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se debe descartar el sobrenadante y preparar los frotis con la capa media, utilizando la tinción ácido-resistente (Singh *et al.*, 2013). El análisis microscópico a 100x con aceite de inmersión puede otorgar un diagnóstico presuntivo de paratuberculosis si se observan grupos de organismos de forma bacilar, pequeños, fuertemente ácido-resistentes (figura 10) (OIE, 2018).

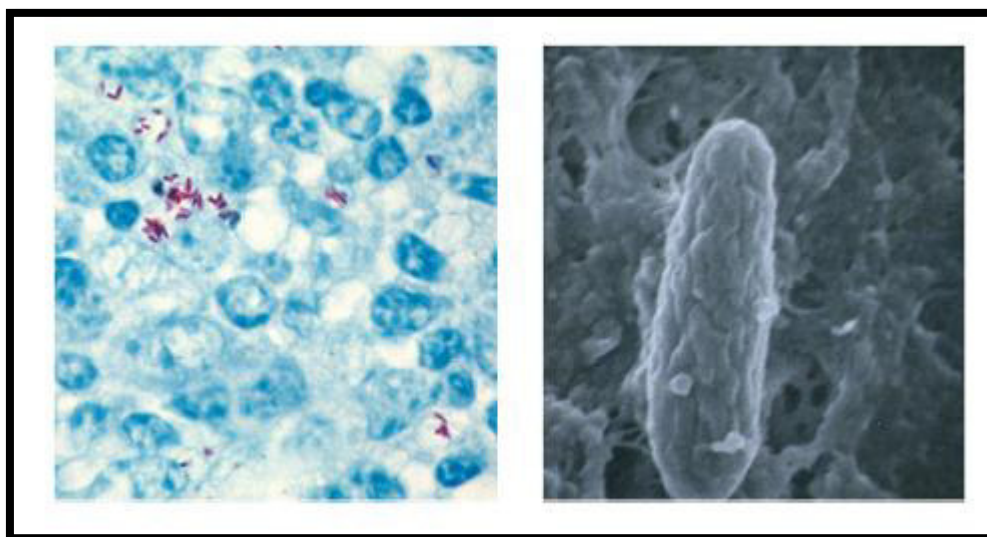


Figura 10. Organismos ácido-resistentes compatibles con *M. avium paratuberculosis* (izquierda). Derecha, microscopía electrónica de una micobacteria.

Fuente: Rathnaiah *et al.* (2017).

Las desventajas de esta técnica es que no puede diferenciar diversas especies de micobacterias, no puede detectar animales positivos que diseminan bajas cargas de micobacterias o que son diseminadores intermitentes (Scott *et al.*, 2011), lo que origina que la microscopía tenga una baja sensibilidad en las fases iniciales de la enfermedad (Maroudam *et al.*, 2015). En cambio, esta prueba se recomienda para usar en vigilancia epidemiológica en animales sospechosos que presentan diarrea (Geetha y Palanivel, 2017) y como base para el desarrollo de programas de control ya que se puede realizar a nivel individual o grupal para abaratar costos (Prieto, 2012).

2.3.3.2. Cultivo

El cultivo ha sido utilizado en décadas pasadas para el diagnóstico definitivo de la enfermedad ya que, aunque es una prueba laboriosa, es la única que no produce resultados falsos-positivos, es decir, tiene 100% de especificidad (Eamens *et al.*, 2015). Se puede realizar en muestras fecales o de tejido intestinal, pero es inadecuado para muestras de leche o sangre por lo que tiene pobre sensibilidad y especificidad en éstas últimas (Geetha y Palanivel, 2017).

Para realizar esta técnica, se necesita que las muestras no tengan químicos o preservantes, si las muestras deben ser preservadas pueden ser congeladas a -70°C. En las muestras de heces se debe realizar una suspensión del material fecal en agua destilada, luego esta suspensión es agitada por 30 minutos y se permite que las partículas sedimenten por 30 minutos adicionales. Finalmente, 0.1 ml del sedimento es sembrado en medio sólido de Herrold conteniendo micobactina. Las muestras de tejido siguen un proceso similar, aunque primero deben pasar por un proceso de digestión (Markey *et al.*, 2013; OIE, 2018).

Las micobacterias patógenas crecen lentamente a una temperatura óptima de 37°C bajo condiciones aerobias y las colonias serán evidentes luego de una incubación de 12 hasta 16 semanas (figura 11) (Quinn *et al.*, 2016). Los medios para el cultivo son a base de huevo, y necesitan hierro, glicerol y piruvato de sodio para mejorar la tasa de desarrollo y la producción de pigmento (Barletta y Steffen, 2013). Aunque las micobacterias son citoquímicamente grampositivas, el alto contenido lipídico y de ácido micólico de la pared celular evita la captación de la tinción Gram (Markey *et al.*, 2013). El método de tinción Ziehl-Neelsen también se utiliza en el cultivo para diferenciar las micobacterias de otros patógenos (Barletta y Steffen, 2013).



Figura 11. Colonias de *M. avium paratuberculosis*.

Fuente: Ortiz *et al.* (2012).

Las principales desventajas incluyen el largo tiempo que se necesita para que las micobacterias desarrollen *in vitro* (Scott *et al.*, 2011), la sensibilidad es muy

baja en animales que diseminan intermitentemente las micobacterias o en muestras que están contaminadas (Gwozdz, 2010), y los costos son altos si se tienen que analizar muchas muestras (Prieto, 2012). La OIE (2018) indica que la sensibilidad del cultivo fecal es de 70% en los animales con signos clínicos, 74% para bovinos en la fase subclínica tardía y solamente 23-29% para bovinos que se encuentran en la fase silente o inician la fase subclínica.

Actualmente, muchos laboratorios utilizan sistemas automatizados de cultivo líquido tales como el sistema radiométrico BACTEC 460, el sistema de detección fluorescente BACTEC MGIT 960 o el sistema de detección de presión TEK ESP. Estos sistemas tienen la ventaja sobre el cultivo en medio sólido en que reducen el período de incubación requerido para detectar el desarrollo desde 12-16 semanas hasta 8-10 semanas para las cepas tipo II de bovino (Geetha y Palanivel, 2017). Sin embargo, tienen la desventaja de dar falsos-positivos durante el cultivo, tienen pasos laboriosos para analizar los resultados y los costos pueden ser altos en relación con el cultivo en medio sólido (Yoo y Shin, 2012).

2.3.3.3. Identificación genética con la reacción en cadena de la polimerasa

Se están creando sondas de ADN para realizar el diagnóstico de paratuberculosis mediante la prueba PCR (Carvalho *et al.*, 2012). Los métodos desarrollados para el diagnóstico de paratuberculosis mediante PCR incluyen una PCR anidada y una PCR en tiempo real. Esta última proporciona un resultado cuantitativo para estimar la cantidad de ADN presente en la muestra y estimar el grado de diseminación fecal (Constable *et al.*, 2017).

El elemento de inserción IS900 ha sido utilizado rutinariamente para detectar la presencia de *M. avium paratuberculosis*, ya que ha sido demostrado que este elemento sólo está presente en este microorganismo (Li *et al.*, 2005). IS900 tiene una secuencia de nucleótidos única que puede ser detectada específicamente por técnicas de PCR, es altamente sensible y específico a marcadores de *M. avium paratuberculosis* entre otras micobacterias y porque esta micobacteria

patógena alberga múltiples copias de IS900 en varios sitios de su cromosoma (Geetha y Palanivel, 2017).

Respecto a las variables de PCR, se ejecutan rutinariamente una PCR anidada, que involucra dos ciclos de amplificación de la misma secuencia utilizando dos diferentes pares de cebadores con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la reacción; una PCR múltiple que utiliza varios pares de cebadores en la misma reacción para amplificar múltiples secuencias del genoma de la micobacteria; y una PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, que usa una sonda marcada con un fluorocromo, con la que se cuantifica la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación y es proporcional a la muestra de ADN presente en la muestra (Gilardoni *et al.*, 2012). La sensibilidad de esta técnica en muestras fecales es estimada en 29% a 99.3% y su especificidad entre 60% y 97% (Britton *et al.*, 2016).

Luego de realizar la técnica de PCR según las recomendaciones de tiempo y temperatura de hibridación, número de ciclos de amplificación y cebadores a utilizar, los fragmentos amplificados deben ser visualizados por electroforesis en gel agarosa al 1% utilizando un transiluminador ultravioleta (Carvalho *et al.*, 2012). En la figura 12 se pueden observar productos PCR amplificados y que aparece en el gel agarosa como líneas en cada carril numerado.

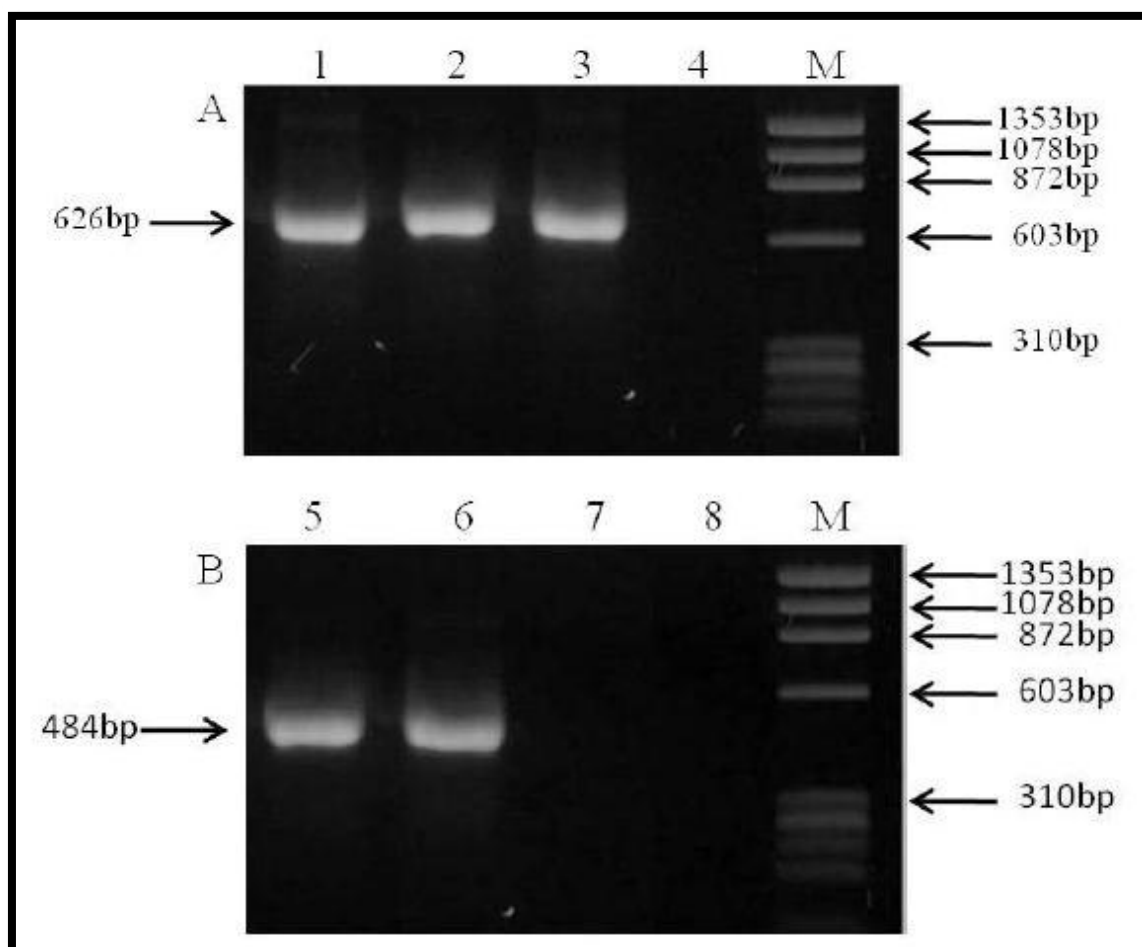


Figura 12. Fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa y visualizados en gel agarosa al 1%, utilizando primers IS900BN1/IS900BN2 (A) y ISMabv2F/ISMabv2B2 (B)

Fuente: Carvalho *et al.* (2012)

Una de las ventajas de esta técnica es que puede realizarse en una gran variedad de muestras clínicas, tales como heces, tejidos intestinales o de nódulos linfáticos, leche fresca y pasteurizada, e incluso se ha realizado en muestras de queso (Yoo y Shin, 2012). También es posible realizar la detección temprana de animales subclínicamente infectados, ya que típicamente la diseminación fecal de micobacterias precede a la formación de anticuerpos; además, esta técnica puede ser realizada para un animal, para un grupo de animales o para muestras ambientales (Eamens *et al.*, 2015; OIE, 2018). La principal desventaja es el costo, ya que no confirma si hay organismos viables y

no permite la diferenciación de cepas, a menos que se realicen algunas técnicas adicionales (Fecteau, 2017).

2.3.4. Técnicas de detección de la inmunidad celular

Existen pruebas que pueden detectar la respuesta inmune sistémica celular que precede a la producción de anticuerpos. Los animales que están en las primeras fases de la infección no suelen reaccionar a las pruebas serológicas debido a que aún no hay una marcada producción de anticuerpos, pero pueden reaccionar positivamente a las pruebas de inmunidad celular, ya que estas pruebas son un indicio de exposición mientras que las pruebas serológicas indican el progreso de la infección (OIE, 2018).

2.3.4.1. Reacción intradérmica

Durante el curso de la infección, los bovinos infectados desarrollan una respuesta inmune celular como protección inicial contra *M. avium paratuberculosis*. La respuesta de hipersensibilidad retardada se detecta tempranamente en la infección y permanece presente en un buen grupo de animales sin signos clínicos. Por lo tanto, la reacción intradérmica puede medir confiablemente la inmunidad celular, pero tiene un valor limitado (Maroudam *et al.*, 2015), ya que la reacción positiva indica sensibilización del animal a micobacterias, incluyendo las del complejo *M. avium* (tuberculosis) y micobacterias saprofíticas ambientales y no necesariamente al agente causal de la paratuberculosis (Gilardoni *et al.*, 2012).

Esta técnica se ejecuta con la inoculación intradérmica de 0.1 ml de antígeno en un área de la piel, usualmente en el tercio medio del cuello, utilizando un derivado proteico purificado tuberculínico aviar o PPD Johnin. El grosor de la piel es medido antes y después de 72 horas post-inoculación. El incremento en más de 2 mm del grosor de la piel es indicativo de reacción positiva (figura 13) (Fecteau, 2017; OIE, 2018). Las ventajas de esta técnica es que puede ejecutarse fácilmente en el campo, y ofrece una oportunidad de detectar

tempranamente a los animales infectados ya que la inmunidad celular se desarrolla antes de la excreción de micobacterias, permitiendo detectar animales infectados en etapa subclínica mucho antes que el cultivo o las pruebas serológicas (Gilardoni *et al.*, 2012).



Figura 13. Reacción intradérmica utilizando derivado PPD Johnin.

Fuente: Bhutediya *et al.* (2017).

La eficacia de esta técnica como diagnóstico de campo es controversial pues presenta bajos valores de sensibilidad, y su uso se limita a ser una prueba complementaria a la prueba de tuberculina en bovinos (Prieto, 2012). Su sensibilidad se ha estimado en 54% y su especificidad puede llegar a 79% (Gilardoni *et al.*, 2012), aunque esta última puede aumentar si aumentan los valores de corte: 91.3% a un valor de corte ≥ 3 mm y hasta 93.5% a un valor de corte ≥ 4 mm (OIE, 2018).

2.3.4.2. Prueba de interferón gamma

En las primeras fases de la infección ocurre un incremento de los niveles de interferón gamma, antes de la presentación de la diseminación fecal de micobacterias, en los animales infectados con paratuberculosis. No obstante, la respuesta con interferón gamma disminuye según la infección progresa y los resultados positivos ya no se correlacionan con la diseminación del agente

causal, por lo tanto, esta prueba se utiliza en la fase silente o subclínica de la infección (Britton *et al.*, 2016).

Para esta prueba se colecta la capa leucocitaria a partir de sangre heparinizada y se expone al antígeno para medir la inmunidad celular por la liberación de interferón gamma. Los linfocitos son sensibilizados durante un período de incubación de 18 a 36 horas con un antígeno específico a *M. avium paratuberculosis*. Luego, la detección cuantitativa se realiza utilizando una prueba de ELISA que usa anticuerpos monoclonales hacia interferón gamma bovino (OIE, 2018). Este método también es utilizado para la detección de citoquinas que indican la exposición del animal a micobacterias patógenas (Maroudam *et al.*, 2015).

La ventaja de esta prueba es la significativa secreción de interferón gamma que ocurre durante las etapas tempranas de la infección y puede ser utilizada para detectar animales en la etapa subclínica. No obstante, muestra una baja sensibilidad cuando es utilizada para detectar la infección en un hato con infección mixta de tuberculosis y paratuberculosis (Geetha y Palanivel, 2017). Gilardoni *et al.* (2012) indican que la sensibilidad de esta prueba es de 41% pero puede disminuir hasta 20% en hatos con infecciones mixtas de tuberculosis y paratuberculosis. Por otro lado, esta prueba aún no se utiliza extensamente debido a la dificultad para interpretar los resultados y porque aún no hay acuerdos sobre el tipo y cantidad de antígenos para estimular los linfocitos sanguíneos (Constable *et al.*, 2017). Jungersen *et al.* (2002) realizaron una prueba para medir la producción de interferón gamma con muestras de sangre entera de 369 bovinos sin signos clínicos de paratuberculosis, pero la cantidad de animales positivos varió entre 64 y 112 dependiendo del protocolo de estimulación de los linfocitos utilizado, encontrando además muchos animales falsos-positivos cuando se aplicó la prueba en muestras de terneros menores de 15 meses de edad. La especificidad varía entre 67% a 94% (OIE, 2018).

2.3.5. Técnicas de detección de la inmunidad humoral

Las pruebas serológicas son útiles para detectar aquellos animales que se encuentran en la fase subclínica de la infección, aquellos que diseminan

intermitentemente el patógeno a través de las heces y pueden ser negativos al cultivo, pero se sospecha que están produciendo anticuerpos (Gümüşsoy *et al.*, 2015). Las pruebas más utilizadas incluyen la fijación de complemento, la inmunodifusión en agar gel y la prueba de ELISA (OIE, 2018).

2.3.5.1. Fijación de complemento (FC)

Esta técnica se fundamenta en la fijación del complemento a los anticuerpos que se originan contra *M. avium paratuberculosis*. Es una prueba ampliamente utilizada para el análisis de los bovinos para exportación, aunque la especificidad es baja en los casos subclínicos (Scott *et al.*, 2011). Esta prueba falla para detectar animales positivos recién infectados o portadores no clínicos (Carvalho *et al.*, 2012), aunque funciona bien para animales clínicamente sospechosos (OIE, 2018). La sensibilidad de esta prueba es baja, alrededor de 40%, pero la especificidad puede llegar hasta 90% en los casos clínicos (De Juan, 2005).

2.3.5.2. Inmunodifusión en agar gel (IDAG)

Esta técnica es útil para confirmar la enfermedad en bovinos clínicamente sospechosos (OIE, 2018). Es una prueba de rápida ejecución, poco costosa y sencilla, con una fácil interpretación (De Juan, 2005). En una placa conteniendo agar gel se perforan tres pocillos para inocular el suero del animal sospechoso, el control positivo y el antígeno soluble. Se permite que las muestras difundan por la placa y si el suero sospechoso contiene antígenos a *M. avium paratuberculosis*, se produce una línea blanca de precipitación entre la muestra y el antígeno (figura 14) (OIE, 2018). Esta prueba tiene una mayor sensibilidad y especificidad que la fijación de complemento, pero es débil detectando casos subclínicos (Sweeney, 2015). Se ha reportado una sensibilidad del 96% y una especificidad de 94% para esta prueba (Constable *et al.*, 2017).

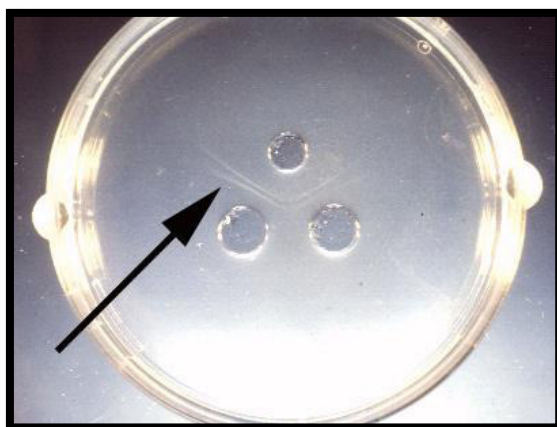


Figura 14. Inmunodifusión en agar gel. La fecha indica la línea de precipitación en animales positivos a paratuberculosis.

Fuente: Universidad de Wisconsin (2019)

2.3.5.3. Prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas

Suele ser la mejor opción de diagnóstico para detectar inmunidad humoral ya que tiene una sensibilidad y especificidad similar a la prueba de fijación de complemento, pero detectando portadores infectados subclínicamente (Gümüşsoy *et al.*, 2015). Es una técnica económica, sencilla de realizar, permite manejar muchas muestras al mismo tiempo, puede ser realizada en suero o en leche y el costo es relativamente bajo, cuando se compara con el cultivo (Yoo y Shin, 2012).

La desventaja de esta prueba radica en que su sensibilidad varía en función del estado inmunológico del animal y es de poco valor con animales que están en la fase inicial de infección que aún no están produciendo anticuerpos (Gilardoni *et al.*, 2012; Prieto, 2012). La sensibilidad de ELISA en suero es 7% en la etapa silente, 15% en la etapa subclínica y 85-98% en la etapa clínica, es decir, la sensibilidad de ELISA se incrementa según progresa la enfermedad (Geetha y Palanivel, 2017).

2.3.6. Aplicabilidad de las pruebas diagnósticas en hatos lecheros

Existen numerosos protocolos para realizar pruebas diagnósticas para detectar paratuberculosis bovina. Su exactitud se describe en términos de sensibilidad, es decir, la proporción de animales enfermos que son detectados, y especificidad, o la proporción de animales saludables que son negativos a las pruebas, sin embargo, todas las pruebas son imperfectas, pues puede haber resultados falso-negativos y falso-positivos. La carencia de una prueba perfecta origina problemas al momento de decidir qué tipo de prueba utilizar para realizar el diagnóstico individual o grupal y para establecer el intervalo de ejecución del diagnóstico (Whittington et al., 2017; OIE, 2018). En el siguiente cuadro (cuadro 5) se presenta una relación de pruebas diagnósticas, según su etapa en que puede ser positiva y la potencial sensibilidad y especificidad que poseen.

Cuadro 5. Aplicabilidad de las pruebas diagnósticas para detectar paratuberculosis en bovinos

Prueba	Etapas de la enfermedad cuando podría ser positiva	Sensibilidad potencial	Especificidad potencial
ELISA en suero	Subclínica, clínica	<40% - >70%	40% - >70%
Reacción intradérmica	Silente, subclínica	40% - >70%	40% - 70%
Interferón gamma	Silente, subclínica	Desconocida	Desconocida
Frotis fecal	Subclínica, clínica	<40%	<40% - 70%
Cultivo fecal	Todas las etapas	<40% - >70%	>70%
PCR fecal	Todas las etapas	40% - >70%	>70%
Cultivo tisular	Todas las etapas	>70%	>70%
Patología	Clínica	<40% - 70%	<40% - 70%
Histopatología	Subclínica, clínica	40% - >70%	>70%
Signos clínicos	Clínica	<40% - 70%	<40% - 70%

Fuente: Whittington *et al.* (2017).

En un estudio retrospectivo realizado por Whittington *et al.* (2019) se analizaron las técnicas de diagnóstico utilizadas en los programas de control de 22 países, siendo las más frecuentes la prueba de ELISA en suero, PCR fecal, el cultivo y el análisis patológico. Asimismo, las pruebas IDAG, de reacción intradérmica y tinción fecal fueron las menos aplicadas. En el siguiente cuadro (cuadro 6) se presenta un resumen del número de países el tipo de prueba que utilizan en sus respectivos programas de control.

Cuadro 6. Tipos de pruebas diagnósticas utilizadas en los programas de control de paratuberculosis en 2012-2018 en cada tipo de crianza*.

Prueba	Bovinos lecheros	Bovinos de carne	Ovinos	Caprinos
ELISA en suero	17	17	9	10
PCR fecal individual	18	17	13	12
Cultivo fecal individual	13	13	9	9
Patología	16	15	13	14
PCR fecal grupal	12	10	5	4
ELISA en leche individual	10	0	1	2
Cultivo fecal grupal	8	8	5	4
ELISA en leche de tanque	6	0	0	1
Cultivo o PCR de muestras ambientales	6	2	1	2
Fijación de complemento	5	5	4	3
Tinción ZN de frotis fecales	4	4	3	3
Reacción intradérmica	1	1	1	1
IDAG con suero	0	0	0	1

*Los números indican la cantidad de países que utilizan la prueba indicada.

Fuente: Whittington *et al.* (2019).

Según la bibliografía revisada, se puede concluir que hasta la fecha no se ha desarrollado una prueba diagnóstica útil aplicable en condiciones de campo. La detección de anticuerpos en suero mediante ELISA es la prueba diagnóstica más económica y práctica de realizar por los ganaderos y veterinarios de campo. Sin embargo, tendría que realizarse a intervalos regulares para detectar a los animales positivos. También podría realizarse pruebas PCR seriadas, aunque el costo sería mayor.

2.4. Eliminación y control de la enfermedad

A pesar de que la paratuberculosis es una enfermedad presente en todo el mundo, hay muchos países que aún no cuentan con un programa oficial de control, incluyendo el Perú. Los principales motivos por los que estos países aún no cuentan con estos programas incluyen las restricciones económicas, insuficientes recursos para la salud animal más allá de aquellos que ya se están

invirtiendo para controlar otras enfermedades, carencia de infraestructura, recursos operativos, servicios de diagnóstico veterinario, y la carencia de factibilidad debido a las inadecuadas herramientas de control tales como las pruebas diagnósticas con baja sensibilidad y las vacunas poco eficaces (Sohal *et al.*, 2015; Camanes *et al.*, 2018; Whittington *et al.*, 2019).

Otros motivos menos frecuentes por los cuales algunos países aún no cuentan con un programa oficial de control son la falta de disponibilidad de vacunas, la creencia de que la enfermedad no es prevalente o importante a nivel de hato o individual y, por lo tanto, no se considera un problema que afecte grandemente la salud animal; la paratuberculosis no se percibe como un problema inmediato, hay carencia de interés por parte de los productores ya que no existen restricciones, hay ignorancia burocrática de parte de las autoridades sanitarias, y falta de financiamiento para los programas de control (Beaunée *et al.*, 2017; Barkema *et al.*, 2018; Strain, 2018).

Los países que cuentan con programas oficiales de control indican la salud y bienestar animal como la principal razón para establecer un programa de control de paratuberculosis, además de reducir las pérdidas económicas o las pérdidas productivas y mantener posibilidades de comercio regional o internacional (McKenna *et al.*, 2006; Sohal *et al.*, 2015; Barkema *et al.*, 2018). Estos países también se caracterizan por tener una regulación explícita de parte de las autoridades sanitarias veterinarias respecto a la enfermedad, que incluye notificación obligatoria y medidas de salud pública (Whittington *et al.*, 2019) y sus estrategias se esquematizan de acuerdo con los objetivos de los programas de control. En el siguiente cuadro se resume los objetivos de los países que cuentan con programas oficiales de control (cuadro 7).

Cuadro 7. Principales objetivos de los programas de control de paratuberculosis	
Objetivo	
Reducir la prevalencia de <i>M. avium paratuberculosis</i>	
Reducir la incidencia de casos clínicos	
Reducir la contaminación por <i>M. avium paratuberculosis</i> en la cadena alimenticia humana y mejorar la seguridad del consumidor	
Proporcionar confianza y seguridad a los mercados, incluyendo la exportación	
Reducir la diseminación del patógeno a nuevas granjas o regiones	

Certificación de hatos libres o de bajo riesgo como una fuente de lotes de reemplazo
Reducir las pérdidas productivas y económicas
Reducir la diseminación del patógeno dentro del hato
Proporcionar medidas y herramientas de control y prevención a los productores
Erradicar la enfermedad a nivel país
Investigar la enfermedad, incluyendo determinar la prevalencia e incidencia
Reducir los animales que diseminan activamente el patógeno
Mejorar las medidas de bioseguridad en el establo
Erradicar la enfermedad a nivel regional
Educar y sensibilizar a todos los participantes de la cadena alimenticia humana

Fuente: Whittington *et al.* (2019).

En este contexto, la detección de todos los animales infectados mediante la ejecución seriada de pruebas diagnósticas tales como ELISA o PCR, será esencial para establecer un adecuado programa de control y eliminación de la enfermedad. Ya que los bovinos sin signos clínicos pueden diseminar el patógeno, el primer paso para la eliminación es el uso de pruebas para realizar un diagnóstico temprano con el fin de identificar y remover a los potenciales diseminadores del patógeno (Yoo y Shin, 2012). Una propuesta para realizar el diagnóstico temprano es la prueba intradérmica utilizando PPD Johnin, que cuenta con una aceptable sensibilidad y especificidad, pero esta prueba podría interferir con el plan de control y erradicación de la tuberculosis bovina, por lo tanto, debería realizarse un cronograma apropiado considerando ambas enfermedades en conjunto. Además, esta propuesta tendría que aprobarse como parte de un programa de control y erradicación de esta enfermedad por las autoridades sanitarias del país. Mientras tanto, la diseminación del patógeno a través de las heces sólo se puede reducir implementando buenas prácticas de manejo y bioseguridad dentro de los hatos lecheros.

La eliminación necesita el compromiso sustancial por parte del ganadero, el Médico Veterinario, el laboratorio y las autoridades sanitarias, y debe estar basada en la identificación y descarte inmediato de todos los animales infectados (Scott *et al.*, 2011). Esto no será factible si la prevalencia de la enfermedad es mayor al 10% (Garcia y Shalloo, 2015), en especial en países como el nuestro, donde no existen sistemas de compensación cuando se realiza el descarte

obligatorio de animales con enfermedades infecciosas importantes (SENASA, 2012).

En cambio, las estrategias de control son versátiles y se pueden adecuar a una zona, un establo, o al potencial riesgo epidemiológico en un país. Las estrategias básicas de control son la modificación de las medidas de manejo, el análisis diagnóstico rutinario de los animales del hato y la decisión del destino de los animales que salen positivos: su descarte inmediato o su separación y mantenimiento hasta que haya oportunidad de eliminarlo (Munir *et al.*, 2014; Whittington *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta la cantidad potencialmente alta de resultados falso-positivos y falso-negativos de las pruebas diagnósticas actuales, la implementación de una estrategia única de análisis y descarte de positivos no se recomienda, y menos cuando la prevalencia de la enfermedad es relativamente alta. Es mejor combinar diversas medidas de control y diagnóstico para que los programas sean justificados y atractivos para el productor, tratando de disminuir lo más posible la prevalencia de la infección hasta llegar a un punto en que sea factible aplicar una estrategia de detección y descarte inmediato (García y Shalloo, 2015).

Cuando ya se ha detectado que un establo es positivo a paratuberculosis bovina, debe formarse un hato paralelo con la descendencia separando inmediatamente al ternero recién nacido y administrándole calostro de las vacas negativas a paratuberculosis bovina. Los animales que conforman este hato paralelo deben ser analizados rutinaria y seriadamente con pruebas tales como ELISA y PCR. Por otro lado, en el hato infectado, se pueden ir eliminando los animales positivos utilizando este mismo protocolo.

2.5. Experiencias de los programas de control y prevención en el mundo

Los programas de prevención y control varían dependiendo de muchos factores. En los países desarrollados, la paratuberculosis ha obtenido el nivel de prioridad más alto para su control con apoyo del gobierno, la industria y los productores. Estos países tienen una crianza con buenas prácticas de higiene,

baja densidad de animales y población humana, sistemas de manejo muchas veces automatizados, mejores sistemas de salud animal y servicios veterinarios, mejor nutrición, mayor productividad por animal, mínima interferencia social o religiosa en la salud y producción animal, todo lo cual ayuda en el control de la enfermedad (Garcia y Shalloo, 2015; Sohal *et al.*, 2015; Whittington *et al.*, 2017).

En cambio, en los países en desarrollo los gobiernos y autoridades sanitarias carecen de iniciativas, comprensión de la enfermedad y las pérdidas que causa, poseen pocos recursos en términos de infraestructura y capacidades humanas. En consecuencia, en estos países la prevalencia de la paratuberculosis continúa aumentando, disminuye la productividad y se incrementa el riesgo para la salud humana (Barkema *et al.*, 2018; Strain, 2018).

En un estudio realizado en 48 países por Whittington *et al.* (2019), se halló que la paratuberculosis es una enfermedad común de los bovinos. En casi la mitad de estos países más del 20% de los hatos estaban infectados. Además, la mayoría de países de este estudio tiene grandes poblaciones de bovinos (millones), crían varias especies de rumiantes domésticos, tienen múltiples sistemas de manejo y decenas de miles de establos individuales, originando un gran desafío para controlar la enfermedad.

En la actualidad, sólo 22 países tienen programas de control formales, principalmente países desarrollados con servicios veterinarios avanzados. De los países sin programas de control de paratuberculosis, 76% fueron de Sur y Centroamérica, Asia y África, mientras que 20% fueron de Europa (Whittington *et al.*, 2019). A continuación, el cuadro 8 describe brevemente algunos programas de control en países con diversas características productivas.

Cuadro 8. Prácticas de control de paratuberculosis en países con un programa oficial de control.

País	Prácticas	Referencia
Estados Unidos	Educación de los productores y veterinarios. Introducción de mejores prácticas de manejo. Diagnóstico del hato.	Bhattarai <i>et al.</i> , 2013; Universidad de Wisconsin, 2019
	Los productores deciden su nivel de participación: a) educación, b) educación y manejo, c) educación, manejo y análisis sin clasificación del hato o educación, d) mejor manejo o diagnóstico para obtener una clasificación de bajo riesgo o libre de paratuberculosis.	
Australia	Desarrollo de estándares nacionales. Programa de aseguramiento del mercado. Procedimientos diagnósticos. Vacunación con vacuna inactivada en ovinos.	Whittington <i>et al.</i> , 2017; 2019
	Los estándares nacionales controlan el programa individual en sus respectivos estados y los programas de aseguramiento del mercado animan a los productores a participar en los programas de control.	
Nueva Zelanda	Descarte inmediato de animales positivos. Intervención de las medidas de manejo. Desarrollo y uso de vacunación.	Gautam <i>et al.</i> , 2018
	Las prácticas de Nueva Zelanda se enfocan principalmente en el impacto en el establo y en el mercado internacional. También realizan investigación en vacunación.	
Dinamarca	Prácticas de manejo de terneros: separación inmediata del recién nacido después del parto.	Nielsen, 2014

	<p>Manejo de maternidades: limpieza y desinfección después de cada parto.</p> <p>La participación en el programa es voluntario, ya que la prevalencia es relativamente alta y se enfocan principalmente en evitar el contacto de los animales con material fecal potencialmente contaminado, independientemente del estado infeccioso de los adultos.</p>	
	<p>Programa basado en beneficios epidemiológicos y evaluación de riesgos. El gobierno participa activamente del programa.</p>	
Países Bajos	<p>Todas las organización gubernamentales relacionadas a la cadena alimenticia humana participan en el programa de control en los Países Bajos, siendo el Servicio de Salud Animal el responsable del programa.</p>	<p>Sohal <i>et al.</i>, 2015; Whittington <i>et al.</i>, 2019</p>
Suecia	<p>Notificación obligatoria. Desinfección rutinaria y completa de todas las instalaciones. Cuarentena a instalaciones, pasturas y tierras de cultivo. Si se detectan animales positivos: rastreo exhaustivo de todos los contactos del hato.</p> <p>Las regulaciones de Suecia son estrictas y se enfocan en evitar, detectar y erradicar cualquier probable fuente de infección.</p>	<p>Sohal <i>et al.</i>, 2015; Whittington <i>et al.</i>, 2019</p>
Reino Unido	<p>Análisis anual de todos los animales mayores de 2 años utilizando ELISA, cultivo fecal o PCR. Los hatos negativos se van clasificando según el número de años negativos. Se eliminan inmediatamente todos los animales positivos. Instauración de medidas de manejo y bioseguridad para minimizar la contaminación fecal. Vacunación de los hatos con prevalencia alta.</p>	<p>McAloon <i>et al.</i>, 2019</p>

	Reino Unido basa su programa en un estándar de certificación sanitaria. Los hatos van subiendo niveles de certificación según la cantidad de años negativos.	
República Checa	<p>Descarte de todos los animales positivos por ELISA.</p> <p>Cultivo fecal dos veces al año para animales mayores de 1.5 años.</p> <p>Los animales están asegurados, como forma de compensación.</p> <p>Los costos del programa son pagados por el gobierno, pero la pérdida del animal es cubierta por el productor o por el seguro.</p>	Sohal <i>et al.</i> , 2015; Whittington <i>et al.</i> , 2019
Canadá	<p>Programas educativos para productores.</p> <p>Programas de manejo y de bioseguridad.</p> <p>Se realizan dos tipos de análisis: a nivel de hato y a nivel individual, dependiendo del número de animales.</p> <p>Los productores y veterinarios pueden elegir entre diferentes planes de manejo.</p> <p>Canadá posee una organización llamada Iniciativa Canadiense para la Enfermedad de Johne, donde participan productores lecheros, la industria lechera, el gobierno y las facultades de Medicina Veterinaria.</p>	McKenna <i>et al.</i> , 2006
India	<p>Análisis, segregación o separación de animales positivos y negativos.</p> <p>Sus bovinos no pueden ser beneficiados, por lo tanto, existen áreas de aislamiento de animales positivos.</p> <p>Sólo los caprinos y ovinos detectados positivos son eliminados inmediatamente.</p> <p>El gobierno no ha establecido un programa oficial de control en bovinos y se limita a prácticas de manejo básicas, aunque dominan las condiciones poco higiénicas y escasas medidas sanitarias que favorecen la presencia de múltiples enfermedades.</p>	Sohal <i>et al.</i> , 2015

2.6. Determinación de la prevalencia

Para poder instaurar un adecuado programa de control y eliminación de la paratuberculosis en un hato lechero, es necesario conocer la prevalencia de la enfermedad dentro de ese hato. Por lo tanto, las pruebas y técnicas de diagnóstico desempeñan un importante papel en la correcta identificación de los animales afectados y sirven como base para implementar el tipo de estrategia de control a utilizar y decidir el destino de los animales positivos (Garcia y Shalloo, 2015).

En hatos con alta prevalencia, More *et al.* (2015) indican que el uso rutinario dos veces al año de una prueba de ELISA en suero y leche junto con cultivo fecal una vez al año de todos los animales mayores de dos años puede otorgar una alta sensibilidad y especificidad para detectar los animales verdaderamente infectados. También estimaron que los costos anuales de realizar estas pruebas son significativamente menores que los costos de descartar los animales con enfermedad clínica. En un escenario hipotético con una prevalencia de 10%, y realizando medidas de manejo elementales tales como la separación de los animales positivos y aplicando medidas de bioseguridad en los animales jóvenes, ellos sugieren que la prevalencia de paratuberculosis puede disminuir a menos de 1% en 5 años, usando esa combinación de las tres pruebas. Si la prevalencia de paratuberculosis está alrededor de 1% o menos, Meyer *et al.* (2019) recomiendan el análisis rutinario de todos los animales mayores de 2 años, dos veces al año utilizando una prueba individual de ELISA en leche (para vacas en lactación) o una vez al año para ELISA con suero, pues este protocolo ofrece una alta sensibilidad anual, aproximadamente 55%.

Identificar correctamente el estado de infección de un animal no sólo depende de la prueba utilizada, también de la etapa de infección en que se encuentre el animal (Whittington *et al.*, 2019). Por consiguiente, se debe recordar que la mayor parte de los animales infectados están en fase subclínica o silente y las pruebas que se elijan deben apuntar a detectar estos animales (Nielsen, 2014). El cuadro 9 muestra las técnicas diagnósticas recomendadas por la OIE (2018) para identificar animales con paratuberculosis.

Cuadro 9. Pruebas recomendadas por la OIE para diagnosticar paratuberculosis en bovinos

Técnica	Objetivo					
	Hato libre	Animal no infectado antes de adquisición	Programa de eliminación	Confirmación de caso clínico	Prevalencia - vigilancia	Estado inmune en el hato
Identificación del agente						
Histopatología	Uso limitado	No	Uso limitado	Primera elección*	No	No
Tinción fecal	No	No	No	Uso limitado	No	No
Cultivo	Primera elección	Primera elección	Uso limitado	Primera elección*	Uso limitado	No
PCR	Uso limitado	Uso limitado	Uso limitado	Segunda elección	Uso limitado	No
Detección de la respuesta inmune						
IDAG	Segunda elección*	No	Uso limitado	Uso limitado	Primera elección*	Primera elección*
ELISA	Segunda elección*	Uso limitado	Uso limitado	Uso limitado	Primera elección*	Primera elección*
FC	No	Uso limitado	Uso limitado	Uso limitado	Uso limitado	Primera elección*
Interferón gamma	No	No	Uso limitado	No	No	Primera elección*
Reacción intradérmica	No	No	Uso limitado	No	No	Primera elección*

* Su elección dependerá del número de animales, costos, sensibilidad u otros factores que limiten su aplicación.

Fuente: OIE (2018).

2.7. Medidas de bioseguridad

El objetivo de las medidas de bioseguridad es evitar la introducción de *M. avium paratuberculosis* proveniente de fuentes de alto riesgo. También, el costo potencial asociado con la paratuberculosis puede ser minimizado si se establecen estas medidas, las cuales, en su mayor parte, exigen cambios en el sistema de manejo, más que inversión y gastos adicionales (Sweeney *et al.*, 2012; Munir *et al.*, 2014).

Los hatos con baja prevalencia de paratuberculosis deben dar prioridad a prácticas de bio-exclusión, es decir, evitar la introducción en el hato de bovinos que podrían estar infectados y tratar de producir sus propios reemplazos libres de enfermedades (Donat *et al.*, 2016). Igualmente, si la prevalencia de la enfermedad es alta, la bioseguridad evitará que la paratuberculosis se extienda desde el hato infectado hacia otros hatos (McAloon *et al.*, 2019). Sweeney *et al.* (2012), Fecteau (2017) y Gautam *et al.* (2018) recomiendan una serie de medidas de bioseguridad para prevenir la introducción de la paratuberculosis en la crianza bovina:

- Proyectar la crianza para ser un hato cerrado, es decir, que produzca sus propios animales de reemplazo. La compra de animales es el principal factor de riesgo para introducir la paratuberculosis en un hato, debido a la imposibilidad de detectar al 100% los animales en fase silente o subclínica.
- Si se debe comprar animales, que sean de establos libres de la enfermedad. Para ello se debe verificar la historia del hato de origen, revisar sus registros de análisis diagnóstico de paratuberculosis y asegurarse que es un hato cerrado.
- Los animales recién adquiridos deben pasar una cuarentena mientras son analizados antes de la introducción a un nuevo hato. Esta cuarentena debe realizarse en un lugar alejado del hato regular, y de preferencia debe tener una infraestructura de fácil limpieza y desinfección.
- No participar en ferias o exposiciones ya que hay posibilidad de contagio directo o indirecto con animales de estado sanitario desconocido.

- En animales al pastoreo, minimizar el contacto con otros bovinos o especies cuyo estado sanitario sea desconocido.
- Restringir el acceso de vehículos, visitantes y profesionales si ellos también visitan otros establos. La instalación de pediluvios, un protocolo de desinfección de vehículos, un protocolo de recepción de visitantes y la implementación de espacios de recepción del alimento y otros equipos e insumos necesarios, que estén alejados del hato, son las principales formas para evitar la introducción de micobacterias a través de fómites.

2.8. Medidas de manejo

El análisis diagnóstico para detectar *M. avium paratuberculosis* es de poco valor si no se realizan esfuerzos para instaurar buenas medidas de manejo que minimicen la posibilidad de diseminación del patógeno. Se ha demostrado que la paratuberculosis puede ser controlada exitosamente con la implementación de estrategias de manejo a largo plazo orientadas a las crías y a los animales (Fecteau, 2017).

2.8.1. Medidas de manejo orientadas a las crías

Ya se ha establecido que la mayor parte de nuevas infecciones ocurren durante el período neonatal y que éstas ocurren por la vía oral-fecal. Por lo tanto, en las crías, las medidas de manejo deben estar enfocadas a disminuir la exposición de los animales jóvenes al estiércol contaminado. Mortier *et al.* (2015); Donat *et al.* (2016) y Fecteau (2017) describen las principales medidas de manejo en las crías:

- Todos los terneros recién nacidos deben ser separados inmediatamente de la madre y ser albergados en cunas individuales que estén lo más alejadas posible de las instalaciones de animales adultos.
- Todos los neonatos deben ser alimentados con calostro de vacas negativas a *M. avium paratuberculosis*, o con calostro comercial. De preferencia

establecer un banco de calostro proveniente de vacas libres de enfermedades. No mezclar el calostro de varias vacas con estado sanitario desconocido.

- Poner énfasis en el cuidado de los terneros y bovinos jóvenes. La meta siempre debe ser disminuir la exposición al *M. avium paratuberculosis* de los animales de reemplazo: para la alimentación de terneros se recomienda utilizar leche de vacas negativas a la enfermedad, leche pasteurizada o suplemento lácteo, evitar la contaminación del alimento y agua de los terneros con estiércol proveniente de los animales adultos, los corrales de los terneros deben estar alejados de los corrales de animales adultos, en los animales al pastoreo, los jóvenes deben pastar en potreros separados de los adultos.
- No utilizar para reemplazo terneras nacidas de madres con paratuberculosis a menos que pueda demostrarse que son libres de la enfermedad.
- Realizar primero el manejo de los terneros y luego el manejo de los animales adultos. Esto es para minimizar la posibilidad de llevar en las botas y ropa estiércol contaminado hacia el área de los terneros.

2.8.2. Medidas de manejo orientadas a los animales adultos

En los animales adultos, las medidas de manejo deben estar orientadas a reducir la prevalencia de la infección por *M. avium paratuberculosis* dentro del hato. Bhattarani *et al.* (2013), Beauneé *et al.* (2017) y Gautam *et al.* (2018) recomiendan las siguientes medidas de manejo:

- Todas las vacas en la fase clínica de paratuberculosis deben ser descartadas inmediatamente.
- Identificar las vacas preñadas positivas a *M. avium paratuberculosis* y usar áreas de parto separadas para ellas. De preferencia la infraestructura de esta área de parto debe ser de fácil limpieza y desinfección.
- Las vacas sin signos clínicos pero positivas a *M. avium paratuberculosis* deben ser separadas físicamente de las vacas negativas, de tal manera que se minimice la exposición al estiércol contaminado.

- Tener un programa rutinario de desinfección del establo. Formol al 5%, hipocloruro de calcio al 2% y fenol a 2.5% eliminan micobacterias.
- Manejar adecuadamente el estiércol producido en el establo, ya que es la principal fuente que alberga las micobacterias patógenas. No utilizarlo para fertilizar cultivos que serán consumidos por los animales.
- Realizar un adecuado manejo y desinfección periódica de las fuentes de agua. El almacén del alimento debe estar separado y protegido de tal manera que no haya posibilidad de contaminación con partículas de estiércol.
- Desinfectar el equipo e instrumental veterinario, en especial si este se contamina con estiércol.
- Si los animales positivos no pueden ser eliminados inmediatamente del hato, segregarlos, es decir, ubicarlos en una zona alejada del hato regular para que sean los primeros en dejar el establo cuando se presente la oportunidad. La leche de estos animales no debería utilizarse para la alimentación de los terneros.

2.9. Eliminación de animales infectados

El objetivo de los programas de eliminación es reducir las probables fuentes de exposición de los animales jóvenes a la paratuberculosis (Gautam *et al.*, 2018). Debido al curso crónico de la enfermedad que causa una emaciación irreversible y la ineficacia del tratamiento de la enfermedad, todos los casos clínicos y subclínicos confirmados deberían ser descartados inmediatamente para evitar la diseminación de la infección (Scott *et al.*, 2011). Pero esto es impráctico por las dificultades que se hallan para hacer un diagnóstico correcto en etapas tempranas de la infección, además de una falta de acción por parte de las autoridades sanitarias que no contemplan programas de compensación o reemplazo de los animales que deban ser descartados (Peek *et al.*, 2018).

2.9.1. En la fase clínica

Se debe recordar que un animal con signos clínicos representa sólo una pequeña fracción de los animales que están infectados, si este animal no es descartado prontamente, diseminará el agente infeccioso y perpetuará la enfermedad en el hato (Magombedze *et al.*, 2013; Strain, 2018). Por lo tanto, la mejor opción siempre será eliminar inmediatamente a todos los animales en la fase clínica de la paratuberculosis, en especial porque se presentan de forma esporádica y no representarán una gran pérdida económica para el productor.

2.9.2. En la fase subclínica

Todos los animales en fase subclínica deberían ser eliminados del hato tan pronto sean detectados. No obstante, esto dependerá de la prevalencia del hato y de los objetivos del productor o del programa de control, que puede ser la eliminación o la disminución de la prevalencia (Beaunée *et al.*, 2017). Si la prevalencia es baja, la eliminación puede incluir a todos los animales positivos, pero si es alta se podría incluir primero a aquellos animales que son los mayores diseminadores fecales de *M. avium paratuberculosis* (Fecteau, 2017).

Si se prefiere descartar sólo a los animales más infecciosos, debe realizarse una clara identificación y segregación de los animales restantes. Y ya que los animales positivos a *M. avium paratuberculosis* tienen mayor riesgo de desarrollar otros procesos infecciosos y tener problemas reproductivos (Yamasaki *et al.*, 2013), deben añadirse a la lista de futuro descarte por estos motivos.

2.10. Vacunación

Se ha probado la vacunación para el control de la paratuberculosis en varios países. La inoculación es realizada en el área del pecho de terneros jóvenes, usualmente menores de un mes de edad, con la formación de una reacción granulomatosa grande. La evidencia muestra que los hatos vacunados tienen menores casos clínicos y pérdidas, pero no logran eliminar la enfermedad.

También, la vacunación parece disminuir la cantidad de micobacterias excretadas y el número de animales diseminadores (Prieto, 2012).

A pesar de que el uso de la vacunación contra paratuberculosis parece prometedor, aún existe controversia sobre su aplicación debido a que hay una potencial interferencia con los programas de control de tuberculosis, ya que puede causar una reacción cruzada que dificulta la interpretación de la prueba intradérmica comparativa de tuberculina (Scott *et al.*, 2011; Garcia y Shalloo, 2015). En consecuencia, no se recomienda el uso de la vacunación en países que tienen en marcha un programa de control de tuberculosis mediante el uso de la prueba de tuberculina (Munir *et al.*, 2014).

III. CONCLUSIONES

La paratuberculosis bovina constituye una de las enfermedades infecciosas más extendida, altamente prevalente y económicamente perjudicial de los bovinos domésticos a nivel mundial. Sólo 22 países cuentan con un programa formal de control y eliminación de la enfermedad. El 76% de los países del sur y Centroamérica, no cuentan con programas oficiales de control de esta enfermedad.

Pese a los avances tecnológicos y científicos, actualmente, el control es difícil de realizar y ofrece un gran desafío a nivel científico y de manejo. La ausencia de una técnica diagnóstica que tenga alta sensibilidad y especificidad en las diferentes fases de la enfermedad continúa siendo uno de los principales problemas para la determinación de la prevalencia, para el control y eliminación de la paratuberculosis bovina en los establos lecheros. El desarrollo de una técnica microbiológica es preponderante.

La detección serológica mediante ELISA es la prueba diagnóstica más económica y práctica de realizar por los ganaderos y veterinarios de campo pero debe complementarse con otra prueba adicional, tal como PCR, estableciendo un protocolo que aplique estas técnicas de manera seriada y rutinaria (cada seis meses) para detectar los animales positivos.

La conformación de un hato paralelo se considera una alternativa efectiva para originar un hato libre de la enfermedad a partir de un hato infectado. Con este propósito, se separa inmediatamente al ternero recién nacido y se alimenta con calostro y leche de vacas negativas a paratuberculosis bovina. Estos

animales del nuevo hato, negativos a la enfermedad, deben ser sometidos a estrictas medidas de manejo y bioseguridad.

Los animales adultos que conforman el hato infectado deben ser analizados rutinaria y seriadamente con pruebas tales como ELISA y PCR. Se debe eliminar a los animales que salgan positivos a ELISA en tres veces consecutivas o a los animales positivos a PCR en cualquier momento. Los animales que presenten la fase clínica avanzada de la enfermedad aunque sean negativos a las pruebas serológicas, deben ser eliminados. También, es importante que se llegue a un diagnóstico definitivo utilizando otras técnicas diagnósticas tales como cultivo, PCR, frotis de heces o histopatología. La necropsia o el seguimiento del caso en camal sería la alternativa más económica.

IV. RECOMENDACIONES

- Es preponderante determinar la prevalencia de paratuberculosis bovina a nivel nacional y regional.
- Se debe realizar más investigación sobre la paratuberculosis bovina en los establos lecheros del país, para establecer los factores de riesgo de la enfermedad.
- Se deben instaurar medidas de bioseguridad estrictas en los establos con el objetivo de minimizar el riesgo de introducción de la paratuberculosis. Para esto se recomienda iniciar con un programa de comunicación para que los productores puedan reconocer la enfermedad y conocer cómo se transmite.
- Se deben realizar estudios para conocer el verdadero impacto económico de la paratuberculosis bovina en el país.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets AP, Rutten VPMG, Bannantine JP, Keefe GP, Kelton DF, Wells SJ, Whittington RJ, Mackintosh CG, Manning EJ, Weber MF, Heuer C, Forde TL, Ritter C, Roche S, Corbett CS, Wolf R, Griebel PJ, Kastelic JP, De Buck J. 2018.** Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound Emerg Dis* 1:125-148. doi: 10.1111/tbed.12723.
2. **Barletta RG, Steffen DJ. 2013.** *Mycobacterium*. En: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. *Veterinary microbiology*. 3^a ed. Iowa: Wiley-Blackwell. p 270-278.
3. **Barratt AS, Arnoult MH, Ahmadi BV, Rich KM, Gunn GJ, Stott AW. 2018.** A framework for estimating society's economic welfare following the introduction of an animal disease: The case of Johne's disease. *PLoS ONE* 13(6): e0198436. doi: 10.1371/journal.pone.0198436.
4. **Bauerfeind R, von Graevenitz A, Kimmig P, Schiefer HG, Schwarz T, Slenczka W, Zahner H. 2016.** *Zoonoses – Infectious diseases transmissible from animals to humans*. 4^a ed. Washington DC: ASM Press. 554 p.
5. **Bhattarai B, Fosgate GT, Osterstock JB, Fossler CP, Park SC, Roussel AJ. 2013.** Perceptions of veterinarians in bovine practice and producers with beef cow-calf operations enrolled in the US Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program concerning economic losses associated with Johne's disease. *Prev Vet Med* 112: 330-337. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.08.009.
6. **Bauman CA, Jones-Bitton A, Jansen J, Kelton D, Menzies P. 2019.** Evaluation of bulk tank milk PCR and bulk tank milk modified ELISA test for the detection of paratuberculosis at herd level in goat and sheep dairies in Ontario, Canada. *J Dairy Sci* 102: 511-520. doi: 10.3168/jds.2018-15020.

7. **Beaunée G, Vergu E, Joly A, Ezanno P. 2017.** Controlling bovine paratuberculosis at a regional scale: Towards a decision modelling tool. *J Theor Biol* 435: 157-183. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.09.012.
8. **Begg DJ, Plain KM, de Silva K, Gurung R, Gunn A, Purdie AC, Whittington RJ. 2018.** Immunopathological changes and apparent recovery from infection revealed in cattle in an experimental model of Johne's disease using a lyophilised culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 219: 53-62. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.029.
9. **Benavides B, Arteaga AV, Montezuma CA. 2016.** Estudio epidemiológico de paratuberculosis bovina en hatos lecheros del sur de Nariño, Colombia. *Rev Med Vet* 31: 57-66.
10. **Boes KM, Durham AC. 2017.** Bone marrow, blood cells, and the lymphoid/lymphatic system. En: Zachary JF, ed. *Pathologic basis of veterinary disease*. 6ª ed. Missouri: Elsevier Mosby. p 724-804.
11. **Bustamante J, Aguilar J, Ortiz M, Bustamante J. 2011.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos lecheros de la zona de Lima detectado mediante tres técnicas diagnósticas. *Rev Inv Vet Perú* 22(4): 394-402.
12. **Bhutediya JM, Dandapat P, Chakrabarty A, Das R, Kumar P, Bandyopadhyay S, Kumar T. 2017.** Prevalence of paratuberculosis in organized and unorganized dairy cattle herds in West Bengal, India. *Vet World* 10(6): 574-579. doi: 10.14202/vetworld.2017.574-579.
13. **Britton LE, Cassidy JP, O'Donovan J, Gordon SV, Markey B. 2016.** Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *Vet J* 209: 32-39. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.10.033.
14. **Camanes G, Joly A, Fourichon C, Romdhane RB, Ezanno P. 2018.** Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: An individual-based modelling approach. *Vet Res* 49: 60. doi: 10.1186/s13567-018-0557-3.
15. **Carta T, Álvarez J, Pérez de la Lastra JM, Gortázar C. 2013.** Wildlife and paratuberculosis: A review. *Res Vet Sci* 94(2): 191-197. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.11.002.

16. **Carvalho IA, Campos VEB, Souza IM, Zanardo LG, Ribeiro Filho JD, Gomes MJP, Moreira MAS. 2012.** Diagnosis of paratuberculosis in cattle: Microbiological culture, serology and PCR. *Braz J Microbiol* 43(2): 581-585. doi: 10.1590/S1517-83822012000200020.
17. **Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. 2017.** Veterinary medicine – A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 11^a ed. Missouri: Elsevier. p 552-565.
18. **De Juan L. 2005.** Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. Tesis para Doctor. Madrid, Universidad Complutense de Madrid. 299 p.
19. **Donat K, Schmidt M, Köhler H, Sauter-Louis C. 2016.** Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J Dairy Sci* 99: 3744-3752. doi: 10.3168/jds.2015-10625.
20. **Eamens GJ, Marsh IM, Plain KM, Whittington RJ. 2015.** Paratuberculosis (Johne's disease). Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedures. 68 p.
21. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2017.** Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the animal health law (regulation EU No. 2016/429): paratuberculosis. *EFSA Journal* 15(7): 4960. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4960.
22. **Faria ACS, Schwarz DGG, Carvalho IA, Rocha BB, De Carvalho Castro KN, Silva MR, Moreira MAS. 2014.** Short communication: Viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artesanal Coalho cheese from Northeastern Brazil. *J Dairy Sci* 97: 1-4. doi: 10.3168/jds.2013-7835.
23. **Fecteau M-E. 2017.** Paratuberculosis in cattle. *Vet Clin Food Anim* 34(1): 209-222. doi: 10.1016/j.cvfa.2017.10.011.
24. **Fernández-Silva JA, Ramírez NF, Correa-Valencia NM. 2017.** Factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cows from Northern Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 30: 48-59. doi: 10.17533/udea.rccp.v30n1a06.
25. **Fiss L, Santos BL, de Albuquerque PPF, Mota RA, Marcolongo-Pereira C, Adrien ML, Soares MP, Schild AL. 2015.** Paratuberculose em bovinos de

- corte na região Sul do Rio Grande do Sul. Pesq Vet Bras 35(5): 437-442. doi: 10.1590/S0100-736X2015000500008.
26. **García AB, Shalloo L. 2015.** The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. J Dairy Sci 98: 1-21. doi: 10.3168/jds.2014-9241.
 27. **Garg R, Patil PK, Singh SV, Sharma S, Gandham RK, Singh AV, Folia G, Singh PK, Jayaraman S, Gupta S, Chaubey KK, Tiwari R, Saminathan M, Dhama K, Sohal JS. 2015.** Comparative evaluation of different test combinations for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infecting dairy herds in India. Biomed Res Int 2015: 983978. doi: 10.1155/2015/983978.
 28. **Gautam M, Ridler A, Wilson PR, Heuer C. 2018.** Control of clinical paratuberculosis in New Zealand pastoral livestock. N Z Vet J 66(1): 1-8. doi: 10.1080/00480169.2017.1379914.
 29. **Gelberg HB. 2017.** Alimentary system and the peritoneum, omentum, mesentery, and peritoneal cavity. En: Zachary JF, ed. Pathologic basis of veterinary disease. 6^a ed. Missouri: Elsevier Mosby. p 324-411.
 30. **Geetha M, Palanivel KM. 2017.** A mini review on diagnosis of Johne's disease in livestock. Int J Curr Microbiol App Sci 6(10): 500-506. doi: 10.20546/ijcmas.2017.610.061.
 31. **Gerrard ZE, Swift BMC, Botsaris G, Davidson RS, Hutchings MR, Huxley JN, Rees CED. 2018.** Survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail pasteurised milk. Food Microbiol 74: 57-63. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.004.
 32. **Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. 2012.** Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. Rev Argent Microbiol 44: 201-215.
 33. **Gümüşsoy KS, Iça T, Abay S, Aydin F, Hizlisoy H. 2015.** Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. Turk J Vet Anim Sci 39: 147-153. doi: 10.3906/vet-1410-96.
 34. **Gwozdz JM. 2010.** Paratuberculosis (Johne's Disease). [Internet], [15 junio 2019]. Disponible en: http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ah/ANZSDP-Johnes_disease.pdf

35. **Hasonova L, Pavlik I. 2006.** Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Vet Med-Czech* 51(5): 193-211.
36. **Jaramillo S, Montoya MA, Uribe JS, Ramírez NF, Fernández-Silva JA. 2017.** Seroprevalencia de paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) en un hato de lechería especializada del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Veterinaria y Zootecnia* 11(2): 24-33. doi: 10.17151/vetzo.2017.11.2.3.
37. **Jenvey CJ, Hostetter JM, Shircliff AL, Stabel JR. 2018.** Relationship between the pathology of bovine intestinal tissue and current diagnostic tests for Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 202: 93-101. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.06.012.
38. **Jesse FFA, Bitrus AA, Abba Y, Sadiq MA, Chung ELT, Hambali IU, Lila MAM, Haron AW. 2016.** Clinical and gross pathological findings of Johne's disease in a calf: A case report. *J Adv Vet Anim Res* 3(3): 292-296. doi: 10.5455/javar.2016.c165.
39. **Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P. 2002.** Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(2): 453-460. doi: 10.1128/CDLI.9.2.453-460.2002.
40. **Koets AP, Gröhn YT. 2015.** Within- and between-host mathematical modeling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infections as a tool to study the dynamics of host-pathogen interactions in bovine paratuberculosis. *Vet Res* 46: 60. doi: 10.1186/s13567-015-0205-0.
41. **Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V. 2005.** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PNAS* 102(35): 12344-12349. doi: 10.1073/pnas.0505662102.
42. **Lombard JE. 2011.** Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim* 27: 525-535. doi: 10.1016/j.cvfa.2011.07.012.
43. **Magombedze G, Ngonghala CN, Lanzas C. 2013.** Evaluation of the "iceberg Phenomenon" in Johne's disease through mathematical modelling. *PLOS One* 8(10): e76636. doi: 10.1371/journal.pone.0076636.
44. **Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013.** Clinical veterinary microbiology. 2^a ed. Edimburgo: Mosby Elsevier. p 161-175.

45. **Maroudam V, Mohana SB, Praveen KP, Dhinakar RG. 2015.** Paratuberculosis: diagnostic methods and their constraints. J Veterinar Sci Technol 6:5. doi: 10.4172/2175-7579.1000259.
46. **McAloon CG, Roche S, Ritter C, Barkema HW, Whyte P, More SJ, O'Grady L, Green MJ, Doherty ML. 2019.** A review of paratuberculosis in dairy herds – Part 2: On-farm control. Vet J 246: 54-58. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.01.009.
47. **McKenna SLB, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, Barkema HW. 2006.** Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. Can Vet J 47: 1086-1099.
48. **Méndez ET, Ramírez IN, Rojas N, Olivares JL, Martínez D. 2013.** Detección de *Mycobacterium avium* paratuberculosis en caprinos ubicados en una zona semi-árida en el municipio de Tecozautla Hidalgo. Rev Salud Anim 35(3): 182-188.
49. **Meyer A, McAloon CG, Tratalos JA, More SJ, Citer LR, Graham DA, Sergeant ESG. 2019.** Modeling of alternative testing strategies to demonstrate freedom from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in test-negative dairy herds in the Republic of Ireland. J Dairy Sci 102: 2427-2442. doi: 10.3168/jds.2018-14883.
50. **Momotani E. 2012.** Epidemiological situation and control strategies for paratuberculosis in Japan. Jpn J Vet Res 60 (Suppl): S19-S29.
51. **More SJ, Cameron AR, Strain S, Cashman W, Ezanno P, Kenny K, Fourichon C, Graham D. 2015.** Evaluation of testing strategies to identify infected animals at a single round of testing within dairy herds known to be infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. J Dairy Sci 98: 5194-5210. doi: 10.3168/jds.2014-8211.
52. **Mortier RAR, Barkema HW, De Buck J. 2015.** Susceptibility to and diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy calves: a review. Prev Vet Med 121: 189-198. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.08.011.
53. **Munir MT, Munir AR, Hassan M, Abubakar M. 2014.** Epidemiology and management strategies of Johne's disease in endemic situations. Res J Vet Pract 2(5): 84-90. doi: 10.14737/journal.rjvp/2014/2.5.84.90.

54. **Nielsen SS. 2014.** Developments in diagnosis and control of bovine paratuberculosis. CAB Reviews 9: 012. doi: 10.1079/PAVSNNR20149012.
55. **[OIE] World Organisation for Animal Health. 2018.** Paratuberculosis (Johne's disease). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 8^a ed. Paris: OIE. 16 p.
56. **Olsen I, Barletta RG, Thoen CO. 2010.** *Mycobacterium*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, eds. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4^a ed. Iowa: Blackwell Publishing. p 113-132.
57. **Ortiz MM, Acosta AM, Acosta GR, Zumarraga MJ. 2012.** Primer informe de aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis en el Perú. [Internet], [4 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/Primer-aislamiento-MAP-en-PERU-revisado.pdf>
58. **Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffré A. 2012.** First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from commercial pasteurized milk in Argentina. Braz J Microbiol 43(3): 1034-1037. doi: 10.1590/S1517-838220120003000028.
59. **Pavlik I, Kaustova J, Falkinham III JO, Kazda J, Shitaye JE. 2009.** Potentially pathogenic mycobacteria. En: Kazda J, Pavlik I, Falkinham III JO, Hruska K, eds. The ecology of mycobacteria: impact on animals' and human health. Londres: Springer. p 37-40.
60. **Peek SF, McGuirk SM, Sweeney RW, Cummings KJ. 2018.** Infectious diseases of the gastrointestinal tract. En: Peek SF, Divers TJ, eds. Rebhun's diseases of dairy cattle. 3^a ed. Missouri: Elsevier. p 337-342.
61. **Prieto M. 2012.** La paratuberculosis bovina. Diagnóstico y control. Tecnología Agroalimentaria 11: 39-44.
62. **Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S. 2016.** *Mycobacterium* species. En: Concise review of veterinary microbiology. 2^a ed. Iowa: Wiley Blackwell. p 54-57.
63. **Rathnaiah G, Zinniel DK, Bannantine JP, Stabel JR, Gröhn YT, Collins MT, Barletta RG. 2017.** Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, the etiologic agent of Johne's disease. Front Vet Sci 4: 187. doi: 10.3389/fvets.2017.00187.

64. **Retamal P, Beltrán C, Abalos P, Quera R, Hermoso M. 2011.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. Rev Med Chile 139: 794-801.
65. **Roussey JA, Steibel JP, Coussens PM. 2014.** Regulatory T cell activity and signs of T cell unresponsiveness in bovine paratuberculosis. Front Vet Sci 1:20. doi: 10.3389/fvets.2014.00020.
66. **Scott PH, Penny CD, Macrae AI. 2011.** Cattle medicine. Londres: Manson Publishing Ltd. p 105-108.
67. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2012.** Caracterización de paratuberculosis bovina en el Perú. [Internet], [4 agosto 2019]. Disponible en: http://repositorio.senasa.gob.pe/bitstream/SENASA/82/1/2012_SENASA_Caracterizacion-Paratuberculosis-Bovina.pdf
68. **Sevilla I. 2007.** Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subespecie Paratuberculosis. Tesis Doctoral .Universidad del País Vasco. p234.
69. **Shaughnessy LJ, Smith LA, Evans J, Anderson D, Caldow G, Marion G, Low JC, Hutchings MR. 2013.** High prevalence of paratuberculosis in rabbits is associated with difficulties in controlling the disease in cattle. Vet J 198(1): 267-270. 10.1016/j.tvjl.2013.08.030.
70. **Shephard RW, Williams SH, Beckett SD. 2016.** Farm economic impacts of bovine Johne's disease in endemically infected Australian dairy herds. Aust Vet J 94: 232-239. doi: 10.1111/avj.12455.
71. **Singh SV, Singh PK, Gupta S, Chaubey KK, Singh B, Kumar A, Singh AV, Kumar N. 2013.** Comparison of microscopy and blood-PCR for the diagnosis of clinical Johne's disease in domestic ruminants. Iran J Veterinary Re 14(4): 345-349. doi: 10.22099/IJVR.2013.1833.
72. **Smith RL, Al-Mamun MA, Gröhn YT. 2017.** Economic consequences of paratuberculosis control in dairy cattle: a stochastic modeling study. Prev Vet Med 138: 17-27. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.01.007.
73. **Sohal JS, Singh SV, Singh B, Thakur S, Aseri GK, Jain N, Jayaraman S, Yadav P, Khare N, Gupta S, Chaubey KK, Dhama K. 2015.** Control of paratuberculosis: Opinions and practices. Adv Anim Vet Sci 3(3): 156-163. doi: 10.14737/journal.aavs/2015/3.3.156.163.

74. **Stabel JR, Bannantine JP, Hostetter J. 2015.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection, immunology and pathology of livestock. En: Mukundan H, Chambers MA, Waters WR, Larsen MH, eds. Tuberculosis, leprosy and mycobacterial diseases of man and animals. Oxfordshire: CABI. p 512-537.
75. **Strain S. 2018.** Johne's disease control: A challenging yet achievable goal. Vet Rec 182(17): 481-482. doi: 10.1136/vr.k1741.
76. **Sweeney RW. 2015.** Paratuberculosis (Johne's disease). En: Smith BP, ed. Large animal internal medicine. 5^a ed. Missouri: Elsevier. p 834-837.
77. **Sweeney RW, Collins MT, Koets AP, McGuirk SM, Roussel AJ. 2012.** Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. J Vet Intern Med 26: 1239-1250.
78. **Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SLB, Keefe GP, Barkema HW. 2006.** Johne's disease in Canada Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. Can Vet J 47: 874-882.
79. **Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. 2017.** Crohn's disease. Lancet 29(10080): 1741-1755. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
80. **Universidad de Wisconsin. 2019.** Johne's Information Center. [Internet], [4 agosto 2019]. Disponible en: <https://johnes.org/pathology/>
81. **Vilar ALT, Santos CSAB, Pimenta CLRM, Freitas TD, Brasil AWL, Clementino IJ, Alves CJ, Bezerra CS, Riet-Correa F, Oliveira TS, Azevedo SS. 2015.** Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Prev Vet Med 121: 49-55. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.06.003.
82. **Wadhwa A, Kumar N, Velasco-Villa A, Eda S. 2013.** Overview of Johne's disease immunology. Vet World 6(11): 901-904. doi: 10.14202/vetworld.2013.901-904.
83. **Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Dhand NK, Plain KM. 2017.** Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). BMC Vet Res 13: 328. doi: 10.1186/s12917-017-1254-6.
84. **Whittington R, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, Arrigoni N, Juste R, Sáez JL, Dhand N, Santi A, Michel A, Barkema**

- H, Kralik P, Kostoulas P, Citer L, Griffin F, Barwell R, Moreira MAS, Slana I, Koehler H, Singh SV, Yoo HS, Chávez-Gris G, Goodridge A, Ocepek M, Garrido J, Stevenson K, Collins M, Alonso B, Cirone K, Paolicchi F, Gavey L, Rahman MT, de Marchin E, Van Praet W, Bauman C, Fecteau G, McKenna S, Salgado M, Fernández-Silva J, Dziedzinska R, Echeverría G, Seppänen J, Thibault V, Fridriksdottir V, Derakhshandeh A, Haghighi M, Ruocco L, Kawaji S, Momotani E, Heuer C, Norton S, Cadmus S, Agdestein A, Kampen A, Szteyn J, Frössling J, Schwan E, Caldow G, Strain S, Carter M, Wells S, Munyeme M, Wolf R, Gurung R, Verdugo C, Fourichon C, Yamamoto T, Thapaliya S, Di Labio E, Ekgatit M, Gil A, Alesandre AN, Piaggio J, Suanes A, de Waard JH. 2019.** Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet Res* 15: 198. doi: 10.1186/s12917-019-1943-4.
85. **Yamasaki EM, Brito MF, Mota RA, McIntosh D, Tokarnia CH. 2013.** Paratuberculose em ruminantes no Brasil. *Pesq Vet Bras* 33(2): 127-140. doi: 10.1590/S0100-736X2013000200001.
86. **Yoo HS, Shin SJ. 2012.** Recent research on bovine paratuberculosis in South Korea. *Vet Immunol Immunopathol* 148: 23-28. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.005
87. **Zachary JF. 2017.** Mechanisms of microbial infections. En: Zachary JF, ed. *Pathologic basis of veterinary disease*. 6ª ed. Missouri: Elsevier Mosby. p 132-241.